



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Evaluación de mecanismos inmunológicos involucrados en el control de enfermedades infecciosas resurgentes (pertussis) y emergentes (COVID-19)

Tesista: Lic. Maia Lina Elizagaray

Director/a: Dra. Griselda Noemí Moreno

Codirector/a: Dra. Daniela Flavia Hozbor

Año: 2022



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas

Evaluación de mecanismos inmunológicos involucrados en el control de enfermedades infecciosas resurgentes (pertussis) y emergentes (COVID-19)

Lic. Maia Lina Elizagaray
Tesis Doctoral
2022

Directora Dra. Griselda Noemí Moreno
Codirectora Dra. Daniela Flavia Hozbor

El presente trabajo de tesis para optar por el grado de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas (Área Ciencias Biológicas) de la Universidad Nacional de La Plata ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. Griselda Noemí Moreno y la codirección de la Dra. Daniela Flavia Hozbor en el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP) – UNLP – CONICET - asociado CIC PBA, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina.

La Plata, febrero de 2022

A Mirta y Atilio

A todas mis ancestras

A mí misma

*Aprende lo más simple.
¡Nunca es tarde para aquellos
cuyo tiempo ha llegado!
Aprende el alfabeto. No alcanza
¡pero apréndelo! No te desanimes.
¡Empieza ya! ¡Debes saberlo todo!
Prepárate para gobernar.*

*Aprende, marginado, hombre del campo,
aprende, ocupante de la cárcel,
aprende, mujer atada a la cocina,
¡aprende sexagenaria!
Prepárate para gobernar.
Ven a la escuela, hombre sin techo.
El saber es para ti que tienes frío.
Hambriento: toma con fuerza el libro: es un arma.
Prepárate para gobernar.*

*¡No temas preguntar las cosas, camarada!
No te dejes influenciar,
averigua tú mismo.
Lo que no sabes por cuenta propia
no lo sabes.
Revisa la cuenta.
Eres tú quien la paga.
Pon el dedo sobre cada cifra.
Pregunta: ¿Cómo llegó esto aquí?
Prepárate para gobernar.*

Bertolt Brecht

Los resultados de esta tesis se han publicado parcialmente en las siguientes publicaciones:

- Elizagaray ML, Gomes MTR, Guimaraes ES, Rumbo M, Hozbor DF, Oliveira SC and Moreno G (2020) Canonical and Non-canonical Inflammasome Activation by Outer Membrane Vesicles Derived from Bordetella pertussis. Front. Immunol. 11:1879. doi: 10.3389/fimmu.2020.01879
- Elizagaray Maia Lina, Mazitelli Ignacio, Pontoriero Andrea, Baumeister Elsa, Raimondi Clemente, Docena Guillermo, Correger Enrique, Rumbo Martin. Lidocaine reinforces anti-inflammatory action of dexamethasone on myeloid and epithelial cells induced by inflammatory cytokines or SARS-CoV-2 infection. (enviado)

RESUMEN

La necesidad de nuevas vacunas para la enfermedad respiratoria denominada tos convulsa, pertussis o coqueluche está bien establecida debido a la situación epidemiológica de resurgencia que se ha comenzado a detectar a partir de los años noventa luego de muchos años de haberla controlado gracias a la aplicación masiva de las vacunas comerciales actualmente disponibles ¹. Por ello, en esta tesis se profundiza en la caracterización de la respuesta inmune desencadenada por un nuevo candidato vacunal contra pertussis. Esta enfermedad altamente contagiosa que afecta a todos los grupos etarios ha resurgido con un aumento preocupante de casos aún en países con altas coberturas de vacunación ²⁻⁶. Si bien pertussis afecta a personas de cualquier edad, los más sensibles a la enfermedad, con riesgo de hospitalización y muerte, son los niños y niñas menores de 6 meses de edad no vacunados o vacunados con esquemas incompletos para su edad. Esta situación de preocupación sanitaria provocó la revisión de las estrategias de prevención y control de esta enfermedad ¹. Así, las medidas que se implementaron y se están implementando refieren al mejor empleo de las vacunas hoy existentes contra la enfermedad de forma de reducir en el corto plazo los casos severos y muertes en los más pequeños ⁷⁻¹⁰. Se incorporaron refuerzos a los esquemas de vacunación en los grupos poblacionales que presentan alta incidencia y que son principales fuentes de contagio para los lactantes, como los adolescentes y adultos, personal de salud, miembros familiares en contacto de un bebé y/o gestantes. En simultáneo a la aplicación de estas medidas sanitarias, la comunidad científica concuerda en la necesidad de mejoras y desarrollo de nuevas vacunas que superen las debilidades de las actuales vacunas en uso. Las vacunas comerciales basadas en el agente causal (la bacteria *Bordetella pertussis* inactivada, vacunas celulares o wP) presentan alta reactividad, y desencadenan un perfil de respuesta inmunológico mixto Th1/Th2/Th17 mientras que las constituidas por inmunógenos proteicos altamente purificados derivados de *B. pertussis* (vacunas de componentes o acelulares aP), si bien son menos reactivas, confieren una inmunidad de corta duración con un perfil predominante del tipo Th2 ¹¹.

Afortunadamente en la actualidad se avanzó en la consolidación de varios candidatos vacunales ¹¹. Uno de ellos, que se encuentra en fase clínica en humanos, corresponde a una formulación a base de bacteria viva atenuada de administración intranasal, BPZE1, que induce una respuesta inmunitaria robusta tanto a nivel mucosal como sistémica ¹²⁻²¹. Otro candidato es el desarrollado a partir de *B. pertussis* enteras inactivadas en la que se ha reducido la cantidad de endotoxina con el

objetivo de reducir la reactogenicidad, pero manteniendo la diversidad de inmunógenos y epitopes ^{22,23}. En lo que refiere a los desarrollos de vacunas acelulares de nueva generación algunos investigadores están trabajando en formulaciones que contienen los mismos inmunógenos que las vacunas actuales pero modificados genéticamente de forma de inducir una respuesta inmunológica más robusta y con un perfil de respuesta Th1 ²⁴; otros agregando nuevos antígenos y/o adyuvantes a las formulaciones acelulares en uso ²⁵⁻²⁹. Una estrategia diferente para el desarrollo de una nueva vacuna acelular fue el abordado por nuestro grupo de trabajo al diseñar una vacuna a base de vesículas de la membrana externa derivadas de *B. pertussis* (BpOMVs por su abreviatura en inglés) (Patente internacional concedida en USA y en trámite en otros países, Application Number: PCT/IB2014/060143) ^{30,31}. Este candidato ha resultado ser tanto inmunogénico como también protector y bioseguro en el modelo murino de protección, con características superadoras en comparación a los dos tipos de vacunas comerciales existentes ^{31,32}. Nuestro candidato vacunal contiene una diversidad de inmunógenos similar a la de la vacuna celular y genera un perfil de respuesta inmunológica mixta Th1/Th2/Th17, pero siendo menos reactogénica ³². Esta nueva formulación induce una respuesta humoral robusta, un perfil protector Th1/Th17 y una población linfocitaria de memoria local en pulmón que la vacuna acelular no es capaz de montar, aunque ambas son seguras en similar medida ^{30,32,33}.

Por ello, en este trabajo de tesis seguimos avanzado en la caracterización de nuestro candidato vacunal basado en las BpOMVs, profundizando en el conocimiento de las poblaciones efectoras y los mecanismos de la respuesta inmune que colaboran en la protección desencadenada por el mismo. En particular, ahondamos en la identificación y caracterización de poblaciones linfocitarias de importancia en el contexto de la inmunización contra pertussis en el modelo murino de infección: linfocitos T CD4, linfocitos T CD8, linfocitos B220. En ese contexto, pusimos en discusión el impacto que tiene la compartimentalización de dichas poblaciones para el establecimiento de los mecanismos protectores en el individuo. Por otro lado, estudiamos las vías y mecanismos de señalización de la inmunidad innata que desencadenan las BpOMVs, en particular los asociados a la vía del inflamosoma, en miras de detallar la articulación entre la activación de la respuesta inmune innata y la respuesta adaptativa protectora que presenta nuestro candidato vacunal. Por último, generamos hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra BpOMVs, los cuales tienen potencial aplicación en diversos estudios de la biología, bioquímica, producción y estandarización, entre otros aspectos, de las BpOMVs y de la bacteria *B. pertussis*. Estas herramientas que caracterizamos bioquímica y funcionalmente

resultan de valor en el trabajo de seguir caracterizando y posicionando nuestro candidato vacunal para ensayos clínicos futuros.

La experiencia y herramientas generadas durante el trabajo en pertussis, me permitieron colaborar en proyectos enfocados a la enfermedad emergente COVID-19 causada por el virus SARS-CoV-2. Esta enfermedad no sólo ha conducido a una gran crisis sanitaria y socioeconómica a nivel global, sino también humanitaria en la cual aún estamos inmersos. El sistema científico, al igual que muchos otros sectores de nuestra sociedad, focalizaron sus actividades en pos de responder a esta situación de crisis. Nuestro grupo se ha sumado a actividades con impacto en las capacidades sanitarias estatales para el manejo de esta pandemia. En particular, participé en dos proyectos, uno enfocado en la generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra distintas proteínas del virus, con potenciales usos en diagnóstico, seguimiento, vigilancia y terapia; y el otro, enfocado en la evaluación de la capacidad inmunomoduladora de una droga ampliamente usada en la clínica y segura (lidocaína) para posible reposicionamiento de la misma para tratar pacientes COVID-19 severos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo a toda la sociedad contribuyente, que son base del financiamiento estatal nacional, la cual fue quien a través de ANPCyT, CONICET y UNLP permitieron formarme durante este período de 6 años. Principalmente a todxs aquellxs que anhelaron una educación pública, gratuita y de calidad y no pudieron acceder a la misma, y enfáticamente a todxs aquellxs que siquiera tuvieron/tienen la oportunidad de anhelarla. Espero que algo de todo lo que se generó en este camino que fue tan fructífero para mi persona, vuelva a ella de alguna forma.

Especiales gracias a mi directora Griselda, que desde el primer momento confió en mí y me permitió emprender este camino. Gracias por esa confianza, por la formación, las enseñanzas (científicas y no científicas), las oportunidades, la comprensión y la paciencia.

A mi codirectora Daniela, por la oportunidad de formar parte (al menos part-time) del VacSal y de trabajar en su tema de investigación. Gracias por la formación, el cariño y el acompañamiento durante todo este trayecto.

A Martín Rumbo, quien fue en igual grado que mis directoras, participe en mi formación. Gracias por las oportunidades, la disponibilidad, el conocimiento, la orientación y la mentoría, en particular, en los dos proyectos en los que participé durante la pandemia y cuyos resultados son plasmados en el Capítulo 4 de esta tesis.

A mi familia. A mi mamá y mi papá, por su sostén, incondicionalidad y paciencia infinitas, por el amor. Por ser el mayor y principal ejemplo de integridad y respeto que tengo, y estoy segura, tendré. A Lucas, por cumplir a la perfección su rol de hermano mellizo, por siempre sacarme de mi zona de confort. Lxs amo profundamente a lxs tres.

Al IIFP todo. Empiezo diciendo que sin ellxs, no hubiera sido capaz de transitar y concluir este camino: A Dave quien me enseñó cultivo celular en las primeras semanas de esta tesis, a María Serradel por enseñarme a hacer hibridomas, a Romi Ceci por básicamente asesorarme en el uso de casi todos los equipos del lab, a Paolis por saber todo y compartirme todo, a todxs lxs que andan siempre en la mesada y me han enseñado, asesorado, recomendado, compartido truquitos y experiencias: Reni, Maxi, Rodri, Costi, Andre, Juan M., Agus, Fede P., Coqui.

También por fuera del entorno laboratorial, especiales gracias de nuevo a Maxi por el aguante y el aliento, Pao, Romi, Reni, Rodri, Andre, Agus y Juanete Mucci... Lindo compartir vida con ustedes.

Al Vaccal, por la buena onda, la disposición, la ayuda: Eri B., Sol, Maga, Pol, Carro, Rudi. A los Sisti, Paz, Fede Z., Keila, Nico. Especiales gracias a Emi, Zuri y Botte por la ayuda y el cariño!

A Sergio Costa y todo su equipo en BH. Gracias por la gran oportunidad, la confianza y el afecto. Desde el primer día me hicieron sentir cómoda y acompañada, y fue una gran experiencia tanto académica como personal. Especiales agradecimientos a Marco Tulio, mi gran mentor brasileiro con ese humor tan particular. A Erika y Sandrinha. A minha querida amiga Ninu, obligada por cuidarme y acompañarme siempre hasta el día de hoy.

Gracias Mari, Ceci M., Loli, Juan Pablo, Iva R., Ague, Oscar., Yanis!!

A Zapiola por el humor y los consejos y la buena onda. A la Ferchu e Iña por alegrar las mañanas y hacer del IIFP un lugar más lindo. A Melany por la citometría de flujo, pero más por las plantas y las charlas y la naturaleza. A JC por hacerme reír y atender todas mis demandas...

A Fer Chirido, Guille Docena, Vero Milesi y Pau Rozenfeld por la cordialidad, por el interés, por ofrecermme y darme ayuda en más de una ocasión.

Al mejor microcirujano que existe, por ser de los pocos, si no el único, que puede hacer lo que hace y compartirlo tan desinteresadamente a quien sea que lo necesite. Gracias Pablito, además, por el aliento, los consejos, la confianza, la charlas, lo compartido.

A Ceci A., porque desde nuestro inicio simultáneo en el instituto me ayudó, sostuvo y escuchó muy por fuera y además de la citometría de flujo. Te quiero!

A Alberto Fosatti por ser una persona tan especial, querible y humilde. Por las anécdotas en los almuerzos y esa sabiduría compartida de manera desinteresada. Por la música clásica a la mañana. Por hacer los días más agradables.

Al grupo Milesi, Nico, Pedro, Valen, Clara, Agus A., por la buena onda de siempre.

¡Gracias a mi querido grupo Rumbo, que nunca falten los journal clubs con catering ni las juntadas de fin de año!

Gracias totales a mis Sisters queridas, Caro, Kari, Male y Gas, por el compañerismo, los viajesitos, las comilonas. Todo fue más transitable y divertido en el lab con ustedes. A la reciente gran incorporación, el Juanito G.

A Male y Gas, tardaron un par de añitos en llegar, pero son lo mejor que me pasó en el IIFP.

Gracias a mis becarios adorados por todo lo compartido: Ema M., Fede P., al viejito y buen Carrito, Lean, Fede O., Mica, Iva I., Juli Va., Juli Ve., Gerito, Ema B., Luz, Emilio. A todxs lxs nuevxs que cada vez son más y no paran de llegar. Y a los que ya no están, la Maicha en especial.

A Gastón por tanta linda compañía.

A mis amigxs colegas que me dio la facu, Peace, Lu y Chari que seguimos compartiendo este camino que es la vida. Por vivir tan de cerca nuestros doctorados, por compartir experiencias, por las caricias al alma que son nuestras juntadas. Al Segun bebé hermoso que Chari nos dio. A Lari, Lore F. y Lore G., por seguir siendo amigas y recuerdo vivo de los primerísimos inicios de esta carrera.

Gracias a todxs mis amigxs y familia por fuera del área científica y de la facu que han sido sostén invaluable de mi permanencia y concreción de este recorrido que fue mi tesis:

A Clara, mi amiga eterna. A la Choster adorada por la ternura. Al resto de las bases fundamentales de la amistad, Caro y Debo. Siempre por siempre en mi corazón.

A mis amigúisimas que el Proyecto Pibe me dio, Guada, Made, Vir y Flor. Y a la Margui bebé por esta nueva alegría y amor. Las quiero profundamente. Al otro gran regalo del PP: mi enorme, loable y hermoso amigo Dydu, pocas veces un antes y después de conocer una persona me ha marcado tanto. Gracias por tanto cariño y tantas enseñanzas.

Gracias exclusivas a mi abuela Roque, gastados los santos de tantos rezos por esta nieta. A la abuela Lina y los abuelos Tono y Quito, no pudieron ser más lindos. Estuvieron muy presentes en este camino que tanto esfuerzo me costó. Para todxs ustedes esto, lxs amo eternamente.

A Joaco y su familia por haberme acompañado en gran parte de este recorrido.

Al taller literario de Mechi Pintos, lugar adorado donde habitan mis poetisas y poetas preferidxs. Especiales a la Florzu, la mejor compañera de viaje que se puede tener, y quien me dio mucha fuerza al inicio y durante este recorrido. A Bet, que con su yoga y energía también fue una gran compañía estos últimos meses.

Al taller de pintura de Susi Solas, espacio hermoso si los hay, en especial a Jose y Anita por además bailar juntas un poco de afro.

A todas las personas que fueron parte de este camino de una forma u otra.

INDICE

RESUMEN	7
AGRADECIMIENTOS	10
INTRODUCCIÓN GENERAL	16
PERTUSSIS: LA ENFERMEDAD	19
TRANSMISIÓN	22
AGENTE ETIOLÓGICO Y FACTORES DE VIRULENCIA	22
VACUNAS CONTRA PERTUSSIS	28
EPIDEMIOLOGÍA	31
INMUNIDAD CONTRA PERTUSSIS: INFECCIÓN NATURAL Y VACUNAS COMERCIALES	38
Construcción del marco teórico a partir del empleo de modelos animales	38
Construcción del marco teórico a partir de la infección natural y la vacunación en el humano	44
NUEVAS VACUNAS CONTRA PERTUSSIS	46
Candidato vacunal a bacteria viva atenuada de administración intranasal	46
Nuevas vacunas celulares menos reactogénicas	47
Nuevas vacunas acelulares con PT genéticamente inactivada	47
Nuevos antígenos y adyuvantes para adicionar a formulaciones aP	48
Vesículas de membrana externa (OMVs) de <i>B. pertussis</i> como candidato vacunal	49
PANDEMIA COVID-19	51
OBJETIVOS GENERALES	53
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
RESULTADOS	56
CAPÍTULO 1. RELEVANCIA EN LA PROTECCIÓN ANTI-PERTUSSIS DE LAS POBLACIONES CELULARES TEJIDO ESPECÍFICA INDUCIDAS POR LA INMUNIZACIÓN EN EL MODELO MURINO	57
Introducción	58
1.1. Producción de ascitis/anticuerpos monoclonales depletantes anti CD4, CD8 y B220	59
1.2. Caracterización del rol funcional sistémico de las poblaciones CD4/CD8/B220 en el contexto del modelo murino de protección.	62

1.3. Caracterización del rol funcional local (pulmonar) de las poblaciones CD4/CD8/B220 en el contexto del modelo murino de protección.	77
Discusión	82
CAPÍTULO 2. ACTIVACIÓN DEL INFLAMOSOMA COMO UNO DE LOS MECANISMOS DE LA RESPUESTA INNATA DESENCADENADO POR LAS BpOMVs.....	86
Introducción	87
2.1. Las BpOMVs son capaces de activar la vía innata del inflamosoma en distintas líneas celulares murinas y humanas.	92
2.2. Las BpOMVs actúan como señal 1 y 2 de activación del inflamosoma. Dependencia del flujo de iones K ⁺	96
2.3. Las BpOMVs son capaces de activar la vía canónica del inflamosoma en BMDM murinos de manera dependiente de NLRP3 y Caspasa-1.....	100
2.4. Las BpOMVs son capaces de activar la vía no canónica del inflamosoma en BMDM murinos. Rol del BpLOS contenido en las BpOMVs en la activación de la misma.	102
2.5. El BpLOS extra e intracelular no es reconocido por la línea humana THP-1.	109
2.6. Las BpOMVs son capaces de activar la vía canónica del inflamosoma por AIM2.	110
2.7. Las BpOMVs son internalizadas por macrófagos murinos.	117
Discusión	123
CAPÍTULO 3. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-BpOMVs	127
Introducción	128
3.1. Generación y caracterización de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-BpOMVs.....	129
3.1.1. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-GroEL: Ensayos de aglutinación	135
3.1.2. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-GroEL: capacidad protectora/opsonizante.	136
3.1.3. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-GroEL: uso para caracterización del tracking intracelular.	140
3.1.4. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-GroEL: cuantificación de OMVs.	142
CAPÍTULO 4. APORTE EXPERIMENTAL A LA PANDEMIA CAUSADA POR EL VIRUS SARS-CoV-2	146
Introducción	147

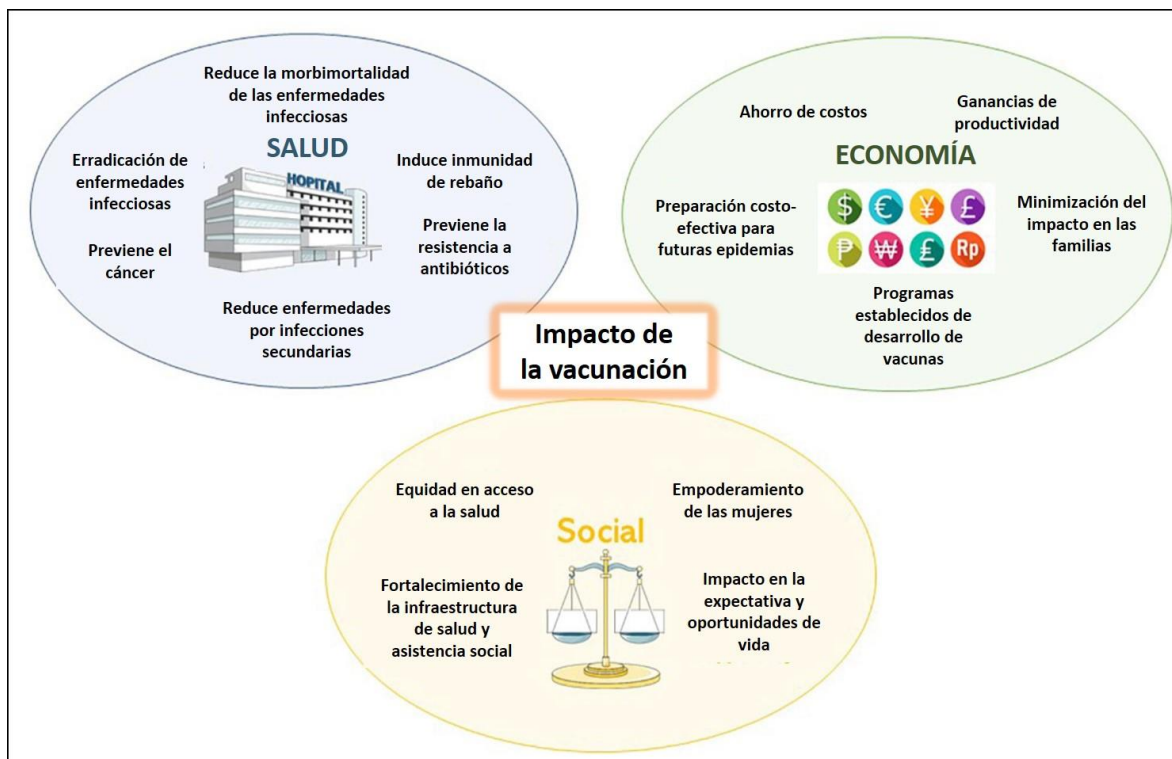
4.1. Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-proteínas RBD y N del virus SARS-CoV-2.	150
4.1.1. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-RBD y anti-N: diagnóstico de COVID-19.....	153
4.1.2. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-RBD y anti-N: capacidad neutralizante.....	156
4.2. Generación de evidencia <i>in vitro</i> de la capacidad inmunomoduladora de la lidocaína y de manera aditiva a la dexametasona, como posible reposicionamiento terapéutico para pacientes COVID-19 severos.....	157
4.2.1. La lidocaína y la dexametasona son capaces de modular de manera aditiva distintas vías inflamatorias de señalización vía receptores Toll.....	158
4.2.2. La lidocaína y la dexametasona son capaces de modular de manera aditiva la señalización inflamatoria por TNFR e IFNGR.	161
4.2.3. La lidocaína y la dexametasona son capaces de modular la activación del factor de transcripción NF- κ B.	162
4.2.4. La lidocaína y la dexametasona son capaces de modular de manera aditiva la activación del inflamosoma.	163
4.2.5. La lidocaína y la dexametasona no son capaces de modular la vía protectora de IFNs de tipo I.	165
4.2.6. La lidocaína y la dexametasona son capaces de modular de manera aditiva la respuesta inflamatoria exacerbada en un contexto de infección <i>in vitro</i> por SARS-CoV-2	166
Discusión	169
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	173
ABREVIATURAS.....	180
MATERIALES Y MÉTODOS.....	182
CAPÍTULO 1.....	182
CAPÍTULO 2.....	189
CAPÍTULO 3.....	197
CAPÍTULO 4.....	202
BIBLIOGRAFÍA.....	212

INTRODUCCIÓN GENERAL

*Come writers and critics
Who prophesize with your pen
And keep your eyes wide
The chance won't come again
And don't speak too soon
For the wheel's still in spin
And there's no tellin' who
That it's namin'
For the loser now
Will be later to win
For the times they are a-changin'*

Bob Dylan

La vacunación como estrategia preventiva de enfermedades infecciosas y las morbi-mortalidades asociadas a ellas ha mostrado ser la intervención sanitaria con mayor impacto socioeconómico en la que los estados deben seguir invirtiendo ³⁴⁻³⁶ (Representación 1).

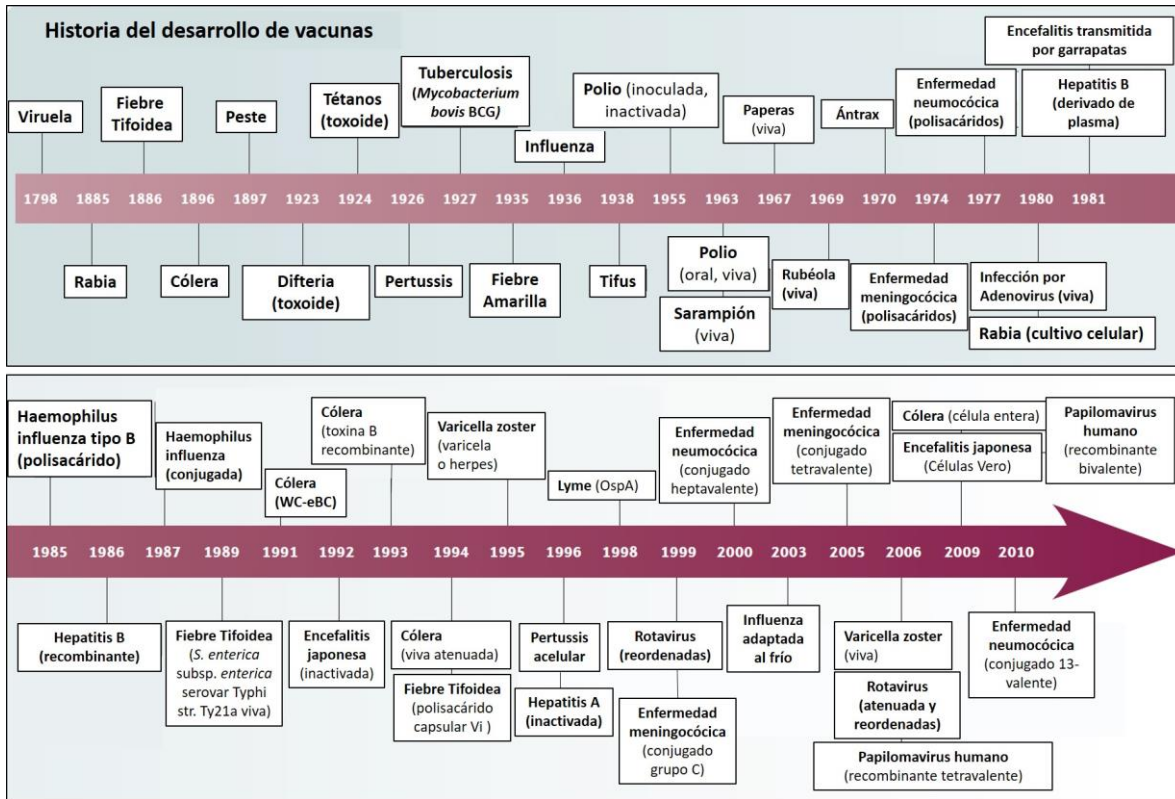


Representación 1. El impacto de las vacunas según su beneficio sanitario, económico o social. Adaptado de Rodrigues & Plotkin 2020.

La vacunación como política pública en busca de proteger a los humanos contra la enfermedad tiene una historia relativamente corta en comparación con los miles de años en que los humanos han tratado de evitar plagas y pestes. Solo en el siglo XX aparece la vacunación como práctica rutinaria en grandes poblaciones. A pesar de su relativa corta historia, el impacto de la vacunación en la salud de la población del mundo ha sido enorme ^{36,37}. Con la excepción del agua potable, ninguna otra intervención ha tenido un efecto tan importante a largo plazo en la reducción de la mortalidad, en el aumento de expectativa de vida y en el crecimiento de la población.

Desde que Edward Jenner diseñó con base científica la primera vacuna en 1798, las vacunas han controlado numerosas enfermedades de grave impacto sanitario en distintas partes del mundo: viruela, difteria, tétanos, fiebre amarilla, pertussis, *Haemophilus influenzae* tipo b, poliomielitis, sarampión, paperas, rubéola, fiebre tifoidea, rabia, rotavirus y hepatitis B. El desarrollo y producción

de diferentes vacunas a lo largo de la historia se muestra en la Línea Temporal 1. La viruela es la única enfermedad que se ha erradicado mediante la vacunación masiva a nivel global ³⁸. Los casos de poliomielitis se han reducido en un 99% y la rubéola y el síndrome de rubéola congénita, sarampión y tétanos neonatal han sido declaradas oficialmente eliminadas de las Américas a partir de 2015, 2016 y 2017 respectivamente ³⁹⁻⁴¹.



Línea Temporal 1. Diseños vacunales a lo largo de la historia. Adaptado de Plotkin & Plotkin 2011.

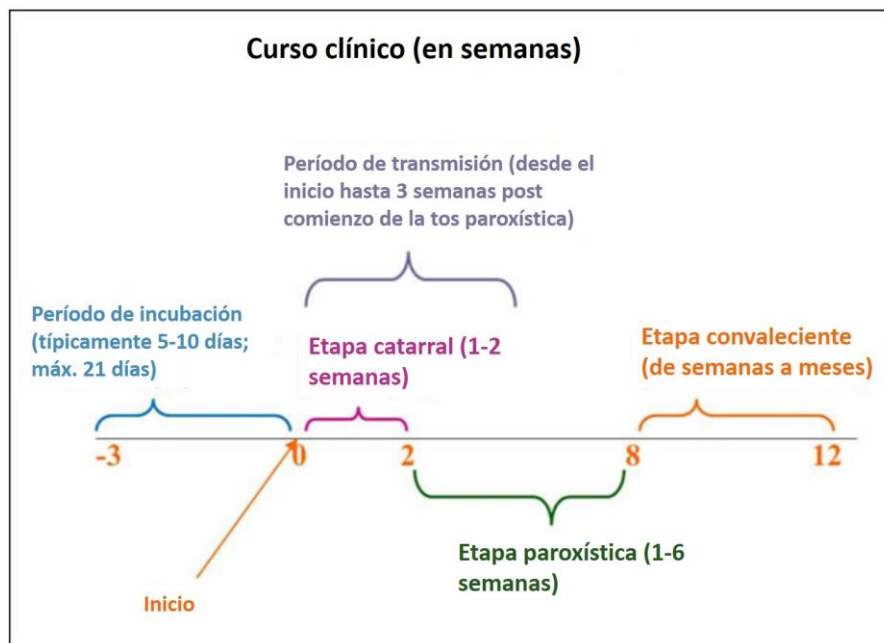
El 60% de las enfermedades infecciosas emergentes son de naturaleza zoonótica, y más del 70% de ellas tienen su origen en la vida silvestre ⁴². Las preguntas que inevitablemente surgen es, si nosotros humanos que representamos el 0,01% de toda la vida sobre el planeta Tierra y hemos destruido el 83% de los mamíferos salvajes y el 50% de las plantas, entre otros catastróficos porcentajes (<https://www.theguardian.com/environment/2018/may/21/human-race-just-001-of-all-life-but-has-destroyed-over-80-of-wild-mammals-study>), realmente queremos seguir aumentando la expectativa de vida y crecimiento de la población. O al menos de manera desarticulada a las causas base de donde devienen estas problemáticas.

Indudablemente se presentan enormes desafíos al tener que combinar los avances que se realizan en el campo de la medicina y en las estrategias de inmunoprevención con la forma en la que nos relacionamos con la naturaleza. Es decir, toda situación de salud humana es una problemática compleja que requiere de una estrategia de intervención holística y transdisciplinaria ⁴³.

La generación de nuevos conocimientos sobre enfermedades re/emergentes, tal como en esta tesis, permite poner a disposición información que se espera contribuya a una mejor toma de decisiones por quien sea pertinente.

PERTUSSIS: LA ENFERMEDAD

La tos convulsa, tos ferina, coqueluche o pertussis es una enfermedad de las vías respiratorias infecto-contagiosa e inmunoprevenible que afecta a personas de todas las edades, siendo los menores de 6 meses no inmunizados los que representan el grupo etario más vulnerable pudiendo ser mortal para ellos ⁴⁴⁻⁴⁶. La enfermedad es causada principalmente por el patógeno *Bordetella pertussis*, y en menor medida por *Bordetella parapertussis*, *Bordetella holmesii* y *Bordetella bronchiseptica* ⁴⁷⁻⁴⁹.



Representación 2. Curso clínico de la tos convulsa. El curso clínico de la enfermedad puede dividirse en tres etapas o fases: Catarral, Paroxística y Convaleciente Adaptado de <https://www.cdc.gov/pertussis/clinical/features.html>

Los signos y síntomas de la enfermedad varían con la edad del paciente, el estado de vacunación, la existencia de una infección previa con *B. pertussis*, el tratamiento con antibióticos y/o la coinfección con otros microorganismos ⁵⁰. El curso clínico de la enfermedad puede dividirse en tres etapas o fases: Catarral, Paroxística y Convaleciente (Representación 2). Los síntomas y signos asociados a pertussis, detallados en la Tabla 1, comienzan a manifestarse, aproximadamente dentro de los 5 a 10 días posteriores a la exposición al patógeno. Sin embargo, a veces pueden no ser evidentes hasta luego de las 3 semanas de haberse contraído la infección. La enfermedad tiene un inicio con síntomas catarrales que son indistinguibles de los de otras infecciones respiratorias menores. Esta fase de la enfermedad denominada catarral suele tener una duración de 1-2 semanas y por lo general se caracteriza por la presencia de rinorrea, estornudos y tos progresiva. Aunque se desconoce la causa de la tos paroxística en pertussis, se presume que son una o más toxinas que provocan la tos a través de un sitio del sistema nervioso central ⁵¹. Al final de la fase catarral suele observarse una leucocitosis con linfocitosis absoluta ^{51,52}. La tos, que inicialmente es intermitente, puede volverse paroxística, lo que daría comienzo a la fase del mismo nombre. En casos típicos de la enfermedad, se presentan los

Etapa	Características clínicas
Catarral	<ul style="list-style-type: none"> - Rinitis - Fiebre leve - Tos leve y ocasional (que gradualmente se vuelve más severa)
Paroxística	<ul style="list-style-type: none"> - Paroxismos de toses numerosas y rápidas debido a la dificultad para expulsar el moco espeso del árbol traqueobronquial - Esfuerzo inspiratorio largo acompañado de un "grito" agudo al final de los paroxismos. - Cianosis - Vómitos y agotamiento <p>Ataques paroxísticos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ocurren con frecuencia por la noche, con un promedio de 15 ataques cada 24 horas - Aumento de la frecuencia durante las primeras 1-2 semanas, permanece con la misma frecuencia durante 2-3 semanas y luego disminuye gradualmente
Convaleciente	<ul style="list-style-type: none"> - Recuperación gradual - Tos paroxística menos persistente que desaparece en 2-3 semanas - Los paroxismos suelen reaparecer con infecciones respiratorias posteriores durante muchos meses después del inicio de pertussis

Tabla 1. Características clínicas de las distintas etapas de pertussis. Adaptado de <https://www.cdc.gov/pertussis/clinical/features.html>

paroxismos o ataques de tos violenta que a menudo son seguidos por un estridor inspiratorio que puede terminar con vómitos. La fase paroxística suele tener una duración de 1-6 semanas, pero puede prolongarse hasta 10 semanas. El paciente no presenta otras manifestaciones entre los momentos de ataques de tos, y éstos ocurren con más frecuencia por la noche. Durante la primera o segunda semana, la frecuencia de los ataques de tos va en aumento y luego se mantiene para ir disminuyendo gradualmente.

La fase de convalecencia, que generalmente dura de 1-3 semanas, se caracteriza por una disminución gradual y continua de la tos. La fiebre en general está ausente o es mínima y suele correlacionarse con la aparición de una infección secundaria ⁵³.

Los bebés menores de 12 meses sin vacunar o con esquema de vacunación incompleto tienen el mayor riesgo de sufrir complicaciones graves, incluso con un desenlace que puede ser fatal. En ellos, la apnea puede ser el único síntoma y la tos puede ser mínima o estar ausente ⁵⁴ (<https://www.cdc.gov/pertussis/about/signs-symptoms.html>).

La gravedad de la infección por *B. pertussis* en niños pequeños ha sido reconocida desde hace más de 100 años ^{51,55}, sin embargo, la complicación clínica más grave de pertussis en lactantes, referida a la hipertensión pulmonar refractaria, no se informó hasta 1993 ⁵⁶. Esta complicación que además conduce a insuficiencia cardíaca y shock, es reconocida actualmente como un problema frecuente en lactantes y con desenlace mortal ⁵⁷⁻⁶⁰. Estudios histopatológicos pulmonares de necropsias de casos fatales de pertussis en ≤ 4 meses de edad revelaron una infección descendente dominada por bronquiolitis necrosante, hemorragia intraalveolar, edema fibrinoso, una marcada leucocitosis y agregados luminales de abundantes leucocitos en pequeñas arterias pulmonares, venas y vasos linfáticos ^{53,61}. Además, se confirmó la presencia de abundantes bacterias *Bordetellae* extracelulares adheridas en los cilios de la tráquea, bronquios y bronquiolos, así como bacterias y antígenos intracelulares en macrófagos alveolares y células epiteliales ciliadas ^{53,61}. Este cuadro deja a los pacientes susceptibles a infecciones secundarias que solo empeoran el cuadro clínico.

En la infección por *B. pertussis* participan todas las toxinas presentes en la bacteria, pero la clínica de pertussis sería consecuencia de la subunidad A de la toxina pertussis (PT) que inhibe las proteínas G de la célula hospedadora, y una segunda toxina aún no identificada que causa la tos característica ("toxina de la tos") ⁵³. Se ha demostrado que la PT es la responsable de la leucocitosis con linfocitosis, hipertensión pulmonar, shock y falla orgánica en lactantes pequeños ^{51,62}.

Pertussis se encuentra dentro de las 6 principales causas de muerte por infecciones en niños menores de 5 años de edad. En 2019, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que 1,5 millones de muertes de niños se deben a enfermedades que podrían haberse evitado mediante la vacunación de rutina (<https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/immunization>).

TRANSMISIÓN

Pertussis es muy contagiosa y se transmite de una persona infectada a otra a través de aerosoles que se generan al respirar, hablar, cantar, pero que se incrementan al toser, estornudar o al compartir un espacio en proximidad durante largos períodos de tiempo y con mala ventilación ⁶³ (https://www.who.int/health-topics/pertussis#tab=tab_1). Los brotes reportados en escuelas demuestran la relevancia del contagio en espacios de estas características ^{64,65}. Las personas infectadas son más contagiosas en la etapa catarral temprana ¹⁰. En entornos domésticos, los contactos juegan un papel importante en la transmisión de pertussis a bebés demasiado pequeños para ser vacunados y, por ende, la población de mayor riesgo ⁶⁶. Gracias a un nuevo modelo en babuinos (*Papio anubis*) se ha demostrado que la transmisión ocurre por aerosoles y contacto estrecho ⁶⁷. En el mismo modelo, aquellos individuos vacunados con la vacuna acelular estuvieron protegidos contra la enfermedad, pero no contra la colonización o transmisión. Esto sugiere que personas asintomáticas pueden transmitir la bacteria a bebés desprotegidos. Otro estudio demostró que las fuentes de infección en lactantes menores de 6 meses son en un 74-96% de los casos los contactos domésticos ⁶⁸.

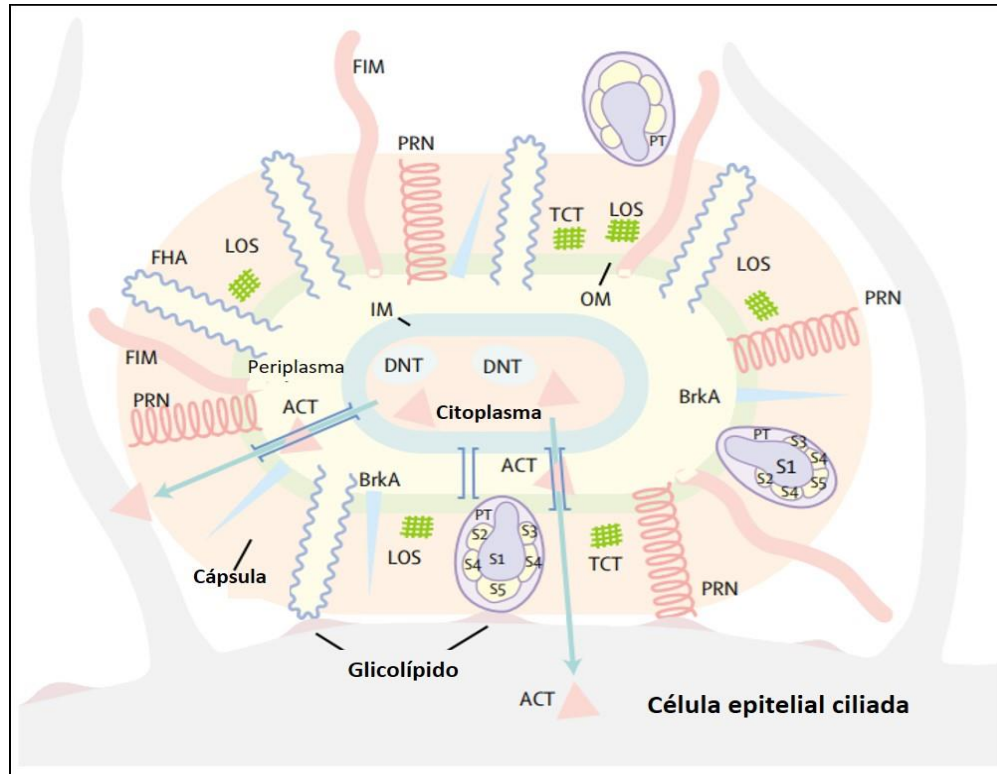
AGENTE ETIOLÓGICO Y FACTORES DE VIRULENCIA

El principal agente etiológico de esta enfermedad es la bacteria *Bordetella pertussis*, estricto patógeno humano, aunque, como se mencionó con anterioridad, otras especies del mismo género como *B. parapertussis*, *B. holmesii* y *B. bronchiseptica* pueden también infectar al hombre ⁴⁷⁻⁴⁹. *B. pertussis* es un cocobacilo Gram-negativo pequeño y de cultivo fastidioso que infecta las células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio humano. Las especies del género *Bordetellae* han mostrado la capacidad de expresar distintos conjuntos de componentes permitiendo a la bacteria presentarse en

distintos fenotipos que, según su virulencia, se los describe como fase virulenta, fase intermedia y fase avirulenta ^{69,70}.

La expresión de la mayoría de los componentes bacterianos que hacen a los distintos fenotipos, con excepción de la citotoxina traqueal y el lipopolisacárido, se encuentran bajo el control de un locus denominado *Bordetella virulence genes* (bvg, anteriormente designado vir por estar asociado con la regulación de la expresión de los factores de virulencia) ^{71,72}. Las bacterias que tienen interrumpido este locus tienen suprimida la expresión coordinada de los genes bvg-activados, por lo que poseen una menor capacidad para causar la enfermedad y, por ello, se las designa bacterias avirulentas ^{69,73}. A este fenómeno irreversible se lo ha denominado cambio de fase y se refiere a la aparición de variantes avirulentas que no expresan los factores de virulencia tales como adhesinas, toxinas y componentes más complejos ^{73,74}. Respecto al mecanismo molecular involucrado en el fenómeno de cambio de fase, en *B. pertussis* se ha propuesto que es el resultado de un corrimiento reversible del marco de lectura en el gen bvgS ⁷⁴. Otro fenómeno mediado por el locus bvg es la denominada modulación fenotípica que, a diferencia del cambio de fase, se trata de una variación continua de expresión de genes en alternancia entre las fases virulenta y avirulenta (también designadas Bvg+ o Bvg- respectivamente) ⁷⁵. La modulación fenotípica ocurre en respuesta a ciertas señales del entorno a las que se denominan moduladores. Hasta el presente sólo se conocen señales que ejercen su acción *in vitro*: baja temperatura, presencia de MgSO₄ o ácido nicotínico en el medio de cultivo. En ausencia de cualquiera de estas señales las proteínas de BvgAS regulan positivamente la expresión de los genes que codifican para los factores de virulencia y negativamente los genes que se denominan vrg (*vir repressed genes*) ^{76,77,78}. En la actualidad, el funcionamiento de este sistema *in vivo* y el rol que tiene en el ciclo infeccioso de *Bordetella* no han sido esclarecidos completamente; y menos aún cuáles serían las señales que se estarían sensando. Experimentos realizados con mutantes de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* bloqueados en Bvg+ o Bvg- demostraron que la fase Bvg+ es necesaria y suficiente para que se desarrolle la infección, mientras que la fase Bvg- sería incapaz de iniciarla ⁷⁹.

Para el desarrollo de las distintas etapas de la infección, la bacteria requiere de una serie de factores, muchos de los cuales ya han sido identificados y caracterizados^{80,81}. En la Representación 3 se ilustra la localización de las distintas adhesinas, toxinas y sistemas complejos que en su conjunto se conocen como factores de virulencia. En la Tabla 2 se presentan algunas de las características más sobresalientes de los principales factores de virulencia de *B. pertussis*.



Representación 3. Factores de virulencia de *Bordetella pertussis*: *B. pertussis* adhiriéndose a una célula epitelial respiratoria del huésped. Adhesinas y toxinas: FIM, fimbrias; FHA, hemaglutinina filamentososa; PRN, pertactina; PT, toxina pertussis; S1–5, subunidades 1–5. ACT, toxina adenilato ciclasa; DNT, toxina dermonecrótica; TCT, citotoxina traqueal; LOS, lipooligosacárido; BrkA, resistencia de *Bordetella* al killing por complemento; IM, membrana interna; OM, membrana externa. Adaptado de Crowcroft & Pebody 2006.

Tabla 2: Características estructurales y funcionales relevantes de los principales factores de virulencia de *B. pertussis*

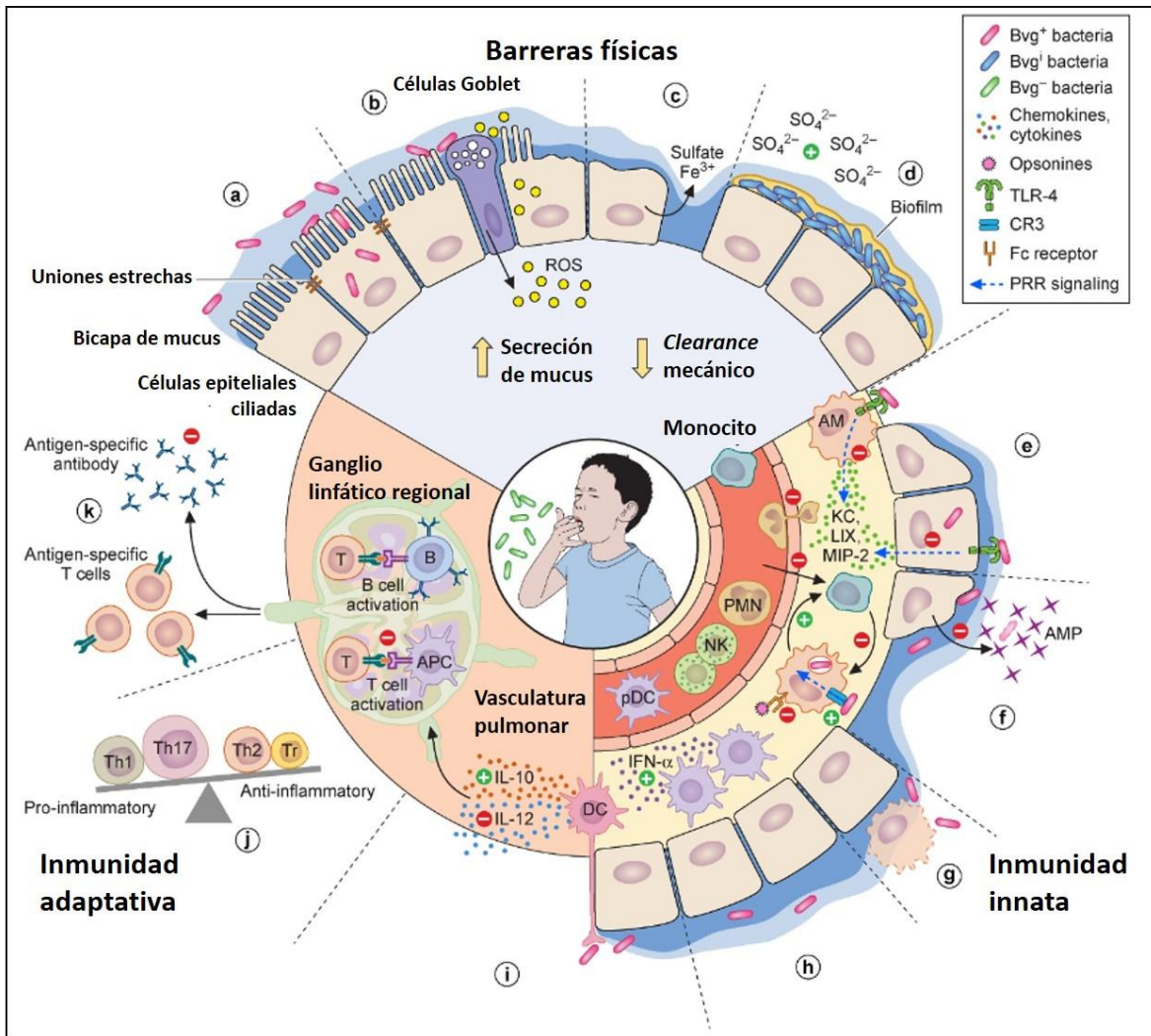
Denominación	Características estructurales y funcionales relevantes
Hemaglutinina filamentososa (FHA)	Es la principal adhesina que expresa <i>B. pertussis</i> . Esta proteína de 220 kDa es necesaria para las primeras etapas de colonización y para la formación de biofilms ⁸² . En ensayos <i>in vitro</i> se ha evidenciado su rol en la invasión de la bacteria a macrófagos y células epiteliales. Esta proteína es inmunogénica y posee capacidad inmunomodulatoria ^{83,84} , por lo que se ha incluido en las formulaciones vacunales acelulares contra la enfermedad ⁸⁵ .
Fimbrias (Fim)	Son estructuras filamentosas de naturaleza proteica que se extienden desde la superficie bacteriana y participan en la adhesión a distintas células del hospedador ⁴⁸ . Los distintos aislamientos clínicos y las diferentes cepas de <i>B. pertussis</i> pueden expresar distintos serotipos de fimbrias en su superficie (Fim2 o Fim3 o ambas). Tanto Fim2 como Fim3 han mostrado ser muy inmunogénicas y, por ello, se las ha incluido en las vacunas contra pertussis. El serotipo predominante de los aislamientos de <i>B. pertussis</i> ha cambiado con el tiempo en la mayoría de los países, cambio que estaría asociado con la posible presión de selección ejercida por las vacunas. Estudios recientes han demostrado que tanto Fim2 como Fim3 se expresan durante la infección y que Fim2 es más inmunogénica que Fim3 ⁸⁶⁻⁸⁸ .
Pertactina (PRN)	Es una proteína de la familia de las proteínas autotransportadoras que está presente en la membrana externa de las especies clásicas de este género. Participa en el proceso de adhesión de la bacteria al hospedador ⁸⁹ . Se ha demostrado que esta proteína tiene un rol relevante no sólo en la patogenicidad, sino también en la protección contra la enfermedad y, por ello, es otro de los componentes proteicos de muchas de las vacunas acelulares en uso.
Factor de colonización traqueal (TCF)	Es una proteína autotrasportadora que solamente es expresada por <i>B. pertussis</i> . Su PM es de 68 kDa ⁹⁰ . La secuencia C terminal de la proteína muestra una identidad del 50% con la secuencia C terminal de la pertactina. Su función está relacionada a la adhesión y colonización de la bacteria ⁵¹ .
Toxina pertussis (PT)	Este factor de virulencia es sintetizado exclusivamente por <i>B. pertussis</i> . A esta toxina del tipo AB5 se le han atribuido la mayor parte de los síntomas de pertussis. También se le adjudica la linfocitosis en sangre periférica. Dado su poder inmunogénico y protector, la toxina pertussis fue el primer antígeno purificado que se incorporó en las formulaciones de vacunas acelulares ^{91,92} . Es el único antígeno empleado en todas las vacunas acelulares comerciales actualmente.
Adenilato ciclasa-Hemolisina (ACT o AC-Hly)	Es uno de los principales factores de virulencia no sólo de <i>B. pertussis</i> sino también de otras especies del género que infectan mamíferos. Esta toxina es bifuncional ya que exhibe actividad catalítica como adenilato ciclasa (AC)

	y actividad hemolítica (Hly) ⁹³ . La actividad AC le permite a <i>B. pertussis</i> afectar las funciones fisiológicas de la célula eucariota, mediante la síntesis descontrolada de cAMP a partir de ATP y activada por calmodulina. Por otra parte, mediante el dominio con actividad hemolisina, es capaz de formar canales selectivos de cationes en las membranas eucariotas. Así, esta toxina es otra de las principales responsables de los efectos citotóxicos causados por <i>B. pertussis</i> ⁹⁴ .
Toxina dermonecrótica (TDN)	Se la ha denominado así por su capacidad de producir lesiones necróticas en piel cuando se la inyecta subcutáneamente en animales de experimentación ^{48,95} . Es una proteína de 160 kDa termolábil sintetizada en el citoplasma de la bacteria, y secretada al medio extracelular.
Toxina citotraqueal (TCT)	Esta toxina es un derivado de la síntesis del peptidoglicano que produce la citopatología característica de la infección de <i>B. pertussis</i> sobre células ciliadas en tejido traqueal. Además, esta toxina también actúa sobre otras células; inhibe la quimiotaxis y el metabolismo oxidativo de neutrófilos, lo cual podría contribuir a la persistencia de <i>B. pertussis</i> en el hospedador ^{96,97} .
Lipooligosacárido (LOS)	Es una molécula anfifílica localizada en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Al igual que en otras bacterias, el LOS de <i>B. pertussis</i> actúa como una potente endotoxina durante el proceso infeccioso, produciendo efectos mitogénicos y tóxicos ⁹⁸ . El rol del LOS en la patogénesis de pertussis estaría relacionado con el proceso de colonización ⁹⁹ .
Proteína asociada a la resistencia a la muerte por complemento (del inglés BrkA)	Esta proteína de 73 kDa inhibe la actividad bactericida del complemento. Se ha demostrado que este polipéptido inhibe la vía clásica de activación del complemento y evita la acumulación de C4 depositado ^{100,101} .
Sistemas de Secreción de Tipo III (TTSS)	Estructura proteica compleja del tipo de jeringas inyectoras con capacidad de traslocar proteínas efectoras directamente en el citoplasma o en la membrana de células eucariotas ^{51,102} .

Debido a la variedad de factores de virulencia implicados y el poder inmunomodulador de varios de ellos, la patogenia de *B. pertussis* es mucho más compleja que la de otras bacterias patógenas ¹⁰³. Aunque el papel y la regulación de los factores de virulencia se han delineado con cierto detalle, no existe un único factor que pueda inhibirse para prevenir la enfermedad ^{104,105}.

El proceso infeccioso de *B. pertussis* comienza al ingresar a las vías aéreas del hospedador mediante aerosoles expelidos por un individuo infectado y una vez dentro del mismo la bacteria en su fase virulenta se adhiere a la mucosa nasofaríngea causando una inflamación leve en la zona. *B.*

pertussis muestra tropismo por el epitelio ciliado de la mucosa respiratoria, aunque puede adherirse a otros tipos celulares como los macrófagos alveolares y las células dendríticas ¹⁰⁶. Las bacterias adheridas proliferan y liberan toxinas causando ciliostasis, daño en el epitelio respiratorio, inducción de la liberación de mucus, inflamación en el lumen del tracto respiratorio e inhibición de funciones de células del sistema inmune del hospedador ¹⁰⁷. La disrupción de la función normal de la mucosa ciliada y el daño del epitelio respiratorio son las patologías primarias asociadas con la infección por *B. pertussis* ¹⁰⁶.



Representación 4. Patogenia de *Bordetella pertussis*. Se detallan los eventos sucesivos y respuestas montadas cuando los diferentes factores de virulencia de *B. pertussis* toman contacto con distintas células del hospedador. Adaptado de Loch & Dubuisson 2021.

La Representación 4 muestra un modelo de patogenia por *B. pertussis* propuesto por Locht y Dubuisson¹⁰⁸, donde se evidencia la compleja interacción entre los factores de virulencia de *B. pertussis* y los mecanismos de defensa del hospedador.

Con respecto a la evolución de *B. pertussis*, los datos indican que las cepas han evolucionado a lo largo del tiempo, detectando claras diferencias entre los aislamientos que prevalecieron en la era pre-vacunal de los que se hicieron post-vacunación¹⁰⁹⁻¹¹². Los primeros informes sobre las divergencias entre aislamientos describieron polimorfismos en genes que codifican proteínas que están incluidas en la vacuna acelular (PRN y PT, entre otros) y más tarde se detectaron variaciones en la secuencia del promotor de la toxina pertussis (ptxP)¹¹³⁻¹¹⁵. Los aislamientos obtenidos de poblaciones inmunizadas con la vacuna wP no muestran cambios genéticos con impacto en el fenotipo¹¹⁶⁻¹¹⁸. Contrariamente, en los aislamientos obtenidos de poblaciones inmunizadas con vacuna acelular se registró un aumento de las cepas de *B. pertussis* que no producen algunos de los antígenos presentes en la vacuna^{119,120} y se ha propuesto que la pérdida de este antígeno probablemente proporcione una ventaja selectiva para la supervivencia bacteriana en poblaciones vacunadas con vacunas aP^{2,121}. Efectivamente, las vacunas comerciales aP que contienen PT, PRN y FHA no son tan efectivas en el control de la infección causada por las recientes cepas circulantes que no expresan PRN¹²¹⁻¹²⁵. Además, recientemente se demostró en un modelo murino de infección mixta, que la cepa de *B. pertussis* deficiente en PRN coloniza el tracto respiratorio de los ratones inmunizados con aP más eficazmente que la cepa PRN positiva¹²⁶. Todos estos datos han marcado la necesidad de no solo continuar con la vigilancia molecular de *B. pertussis* sino además de avanzar en el desarrollo de nuevas vacunas capaces de controlar mejor las infecciones causadas por bacterias deficientes en la expresión de antígenos vacunales.

VACUNAS CONTRA PERTUSSIS

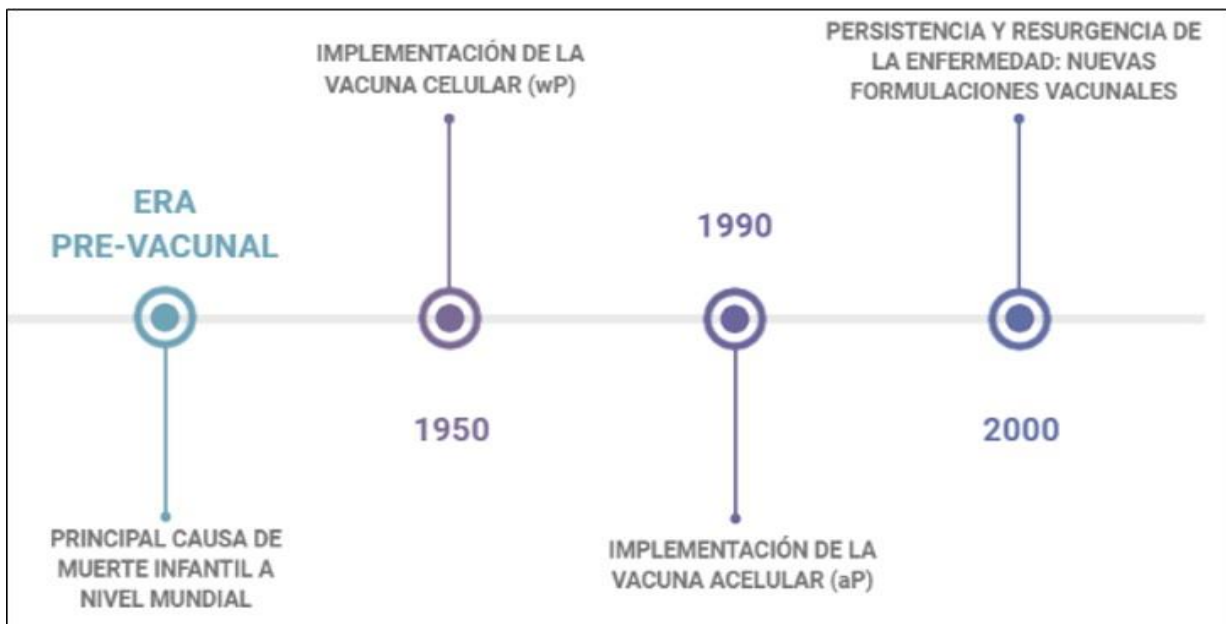
Las primeras experimentaciones con vacunas contra pertussis comenzaron después de que Jules Bordet y Octave Gengou del Instituto Pasteur de Bruselas identificaran el agente etiológico en 1906. Estas primeras vacunas se formularon a partir de células enteras de *B. pertussis* muertas por calor.

En los años siguientes, este tipo de vacuna (llamadas wP por su nombre en inglés, whole Pertussis, o vacuna a células enteras) se utilizó en niños de diferentes países. Desde los primeros desarrollos hubo varias mejoras de la vacuna, pero gracias a los perfeccionamientos en los métodos de cultivo de la bacteria es que Pearl Kendrick, Grace Eldering y Loney Gordon desarrollaron una vacuna inactivada de células enteras altamente eficaz. A fines de la década de 1940, combinaron la vacuna contra pertussis con los toxoides diftérico y tetánico para convertirse en la hoy conocida vacuna triple bacteriana DTP (Difteria Tétanos y Pertussis)¹²⁷. El Comité de Enfermedades Infecciosas de la Academia Americana de Pediatría de Estados Unidos sugirió en 1944 y recomendó en 1947 el uso rutinario de esta vacuna que luego se extendió a otros países. Las coberturas de vacunación mejoraron cuando se estableció el Programa Ampliado de Inmunización (EPI) en 1974. Después de este importante logro en el control de la enfermedad, desafortunadamente, comenzaron a surgir dudas sobre la seguridad de las vacunas wP, lo que llevó a una disminución en la aceptación de este tipo de formulación por parte de la población¹²⁸. Algunos países como Suecia, Reino Unido y Japón disminuyeron e incluso interrumpieron su uso^{129,130}. La vacunación con wP puede ocasionar efectos adversos como los inflamatorios locales (enrojecimiento, hinchazón y dolor en el lugar de la inyección) y la fiebre, habitualmente asociados a muchas vacunas. Las vacunas wP desencadenan muy frecuentemente llanto prolongado y febril, convulsiones y muy raramente, episodios hipotónicos-hiporreactivos^{131,132}. En un momento, se llegó a alegar que la vacunación con wP era la causa de problemas neurológicos que se habían observado en un número muy pequeño de pacientes luego de la vacunación¹³³. Más tarde, se demostró que dichos casos no estaban relacionados con la vacuna, pero el daño a la reputación de la misma ya estaba hecho. La vacuna celular contra pertussis fue señalada de causar discapacidades intelectuales y físicas, incluso a través de un documental en la televisión norteamericana¹³⁴. Esto provocó la formación de la agrupación "Padres insatisfechos juntos", que eventualmente se convertiría en el Centro Nacional de Información sobre Vacunas que hasta el día de hoy sigue siendo una de las principales fuentes de desinformación sobre vacunas en los Estados Unidos. De este evento surgió una nueva ley que protege a las industrias productoras de vacunas de las millonarias demandas que se le realizaron¹³⁵ (<https://www.congress.gov/bill/99th-congress/house-bill/5546>). Dicha ley es utilizada por los movimientos antivacunas como "prueba" de lo peligrosas que son las mismas.

Las preocupaciones sobre la seguridad de la vacuna celular y la no aceptación de la misma en algunas poblaciones finalmente condujeron al desarrollo de nuevas vacunas contra pertussis (segunda generación de vacunas), las cuales se basan en componentes proteicos purificados de *B. pertussis*¹³⁶.

Estas formulaciones de componentes o acelulares (aP) resultaron ser seguras y ello devolvió confianza a la población sobre la vacunación contra pertussis. Las primeras vacunas de este tipo, que contenía sólo la toxina pertussis (PT), se comenzaron a utilizar en Japón durante 1981¹³⁷. Su composición luego fue modificada incrementando el número de inmunógenos con los que se formularon las vacunas. Así, estas formulaciones más bioseguras, pero también más costosas, comenzaron a reemplazar paulatinamente las vacunas celulares en varios países, principalmente, en los industrializados. En la Línea Temporal 2 se representa cronológicamente el desarrollo de las distintas vacunas anti-pertussis.

Siendo que la asociación de reacciones adversas severas por la vacunación con la vacuna wP nunca pudo ser demostrada^{138,139}, la OMS publicó su posición respecto del uso de estas vacunas¹⁴⁰. En particular, se difundió que las vacunas a células enteras pueden emplearse para cubrir las dosis primarias y los primeros refuerzos en niños menores de 7 años ya que no existe ninguna evidencia que



Línea Temporal 2. Desarrollo histórico de vacunas anti-pertussis.

contraindique su uso. Para la población menor de 7 años de edad, pueden emplearse también las vacunas acelulares de presentación pediátrica. Las vacunas acelulares pediátricas al igual que las vacunas celulares, pueden presentarse combinadas con otras vacunas además del componente tetánico y diftérico; por ejemplo, *Haemophilus influenzae* (Hib) o polio inactivada (IPV). Para la población mayor de 7 años no se recomienda el uso de vacunas celulares para el componente pertussis,

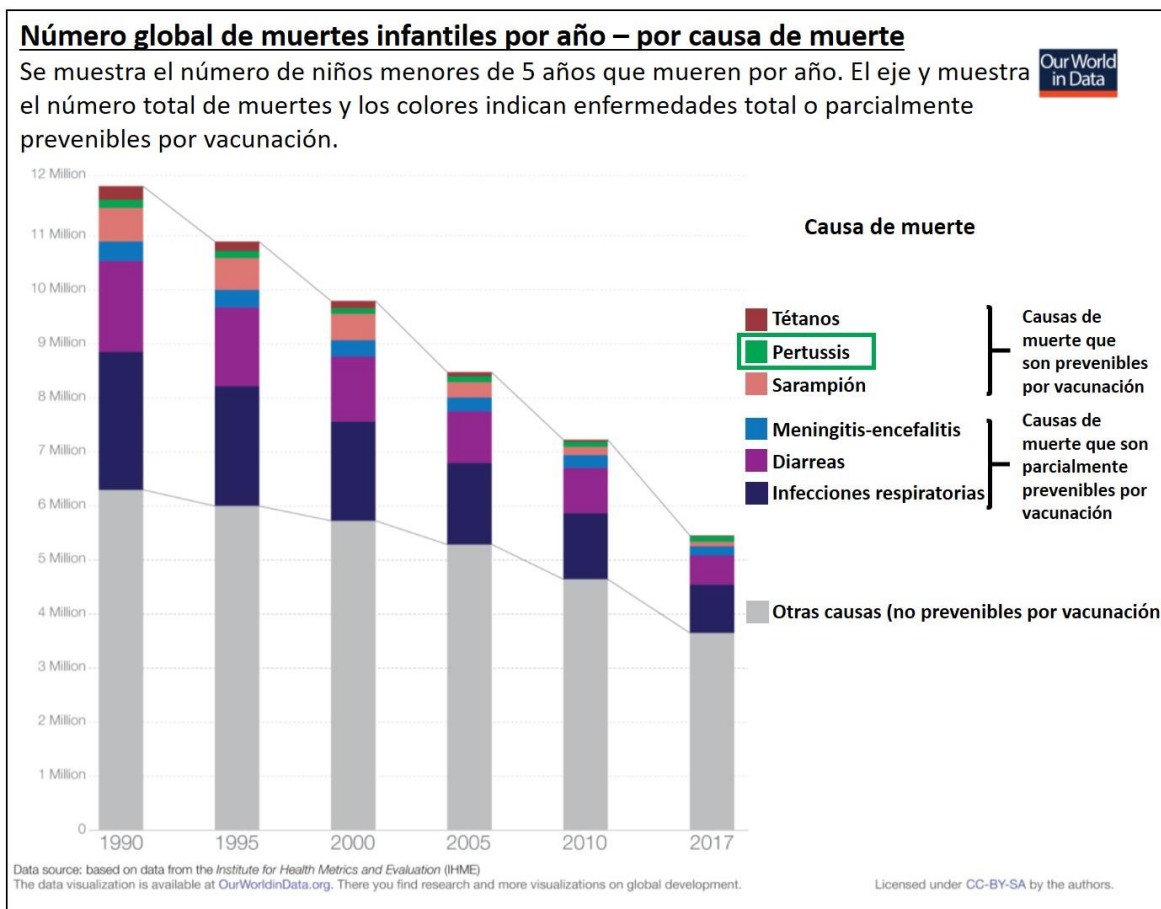
sólo se indica el uso de vacunas acelulares con la misma composición en términos de inmunógenos, pero en diferentes dosis. Las formulaciones acelulares para los adolescentes y adultos también se presentan combinadas con tétanos y difteria.

EPIDEMIOLOGÍA

Antes de la introducción de la vacunación masiva en la década de 1950, pertussis era la primera causa de muerte infantil en el mundo. Hay estadísticas de principios del siglo XX que reportaban una tasa de mortalidad promedio del 10% en niños ¹³⁴. Los primeros datos sobre la enfermedad, aunque limitados, indican que la mayor parte de la población estuvo infectada en la infancia y de esas personas, más del 50% desarrolló enfermedad clínica ¹³⁴. Según datos de la era pre-vacunal de Estados Unidos, aproximadamente el 80% de los casos ocurrieron en niños menores de 5 años y menos del 3% de los casos en personas mayores de 15 años ¹³⁴. Las tasas de mortalidad fueron y siguen siendo más altas en la infancia ¹⁴¹⁻¹⁴³. Estos primeros datos probablemente estén sesgados por la presentación más grave de la enfermedad y pueden no reflejar la incidencia real de casos que incluyan también a los más leves en todos los grupos etarios. Gracias a la vacunación, la morbi-mortalidad asociada a la enfermedad se redujo drásticamente. Por ejemplo, en los Estados Unidos, comparando las eras pre y postvacunales, la disminución en el número de casos de pertussis fue de un 92,2% y la reducción en las muertes del 99,3% ¹⁴⁴. En Argentina, se ha observado un comportamiento epidemiológico de la enfermedad similar ^{145,146} (Ministerio de Salud de la Nación. Argentina MdSdIN Integrated Surveillance Bulletin. Sanitary and Promotion Secretary. Argentina. Disponible en: <http://wwwmsal.gov.ar/index.php/home/boletin-integrado-de-vigilancia>).

Epidemiológicamente, esta enfermedad se presenta como endémica con brotes epidémicos cada 3-5 años y, en la actualidad, a pesar de las altas tasas de vacunación desde hace 70 años, pertussis continúa siendo un problema de salud pública ^{1,147-151}. Las últimas estimaciones indican que por año en el mundo se producen 24,1 millones de casos de los cuales 160.000 resultan ser fatales ¹⁵². Pertussis se encuentra dentro de las 6 principales causas de muerte por infecciones en niños menores de 5 años de edad; y junto con el tétanos y el sarampión, son las tres principales enfermedades prevenibles por vacunación que siguen causando dichas muertes (Representación 5).

Es importante resaltar que existen muchas limitaciones para estimar la incidencia global de la enfermedad porque no hay consensos universales ni homogeneidad en cuanto a la definición de caso, estandarización de protocolos de laboratorio a nivel global, infraestructura y entrenamiento de los profesionales para la vigilancia continua y la sospecha del caso clínico en todas las edades.

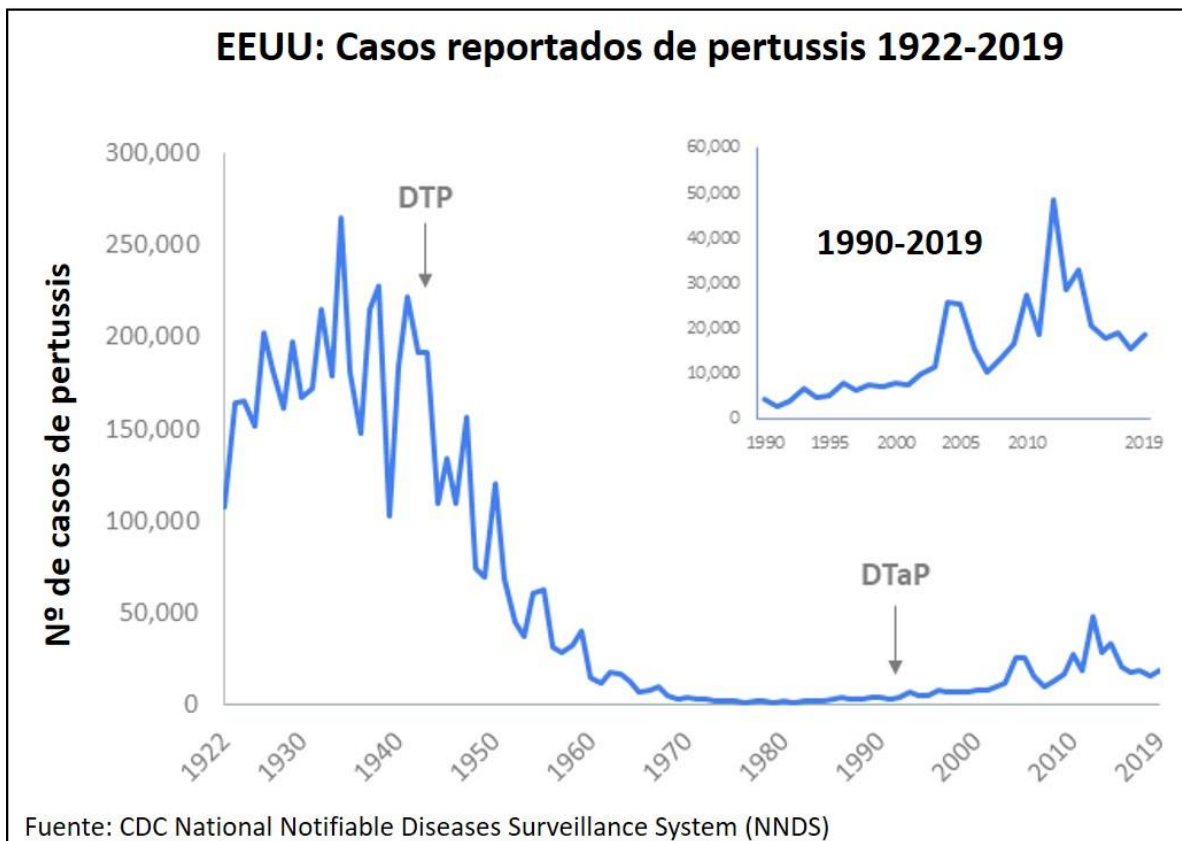


Representación 5. Números globales de casos fatales infantiles (menores de 5 años) por año por causa de muerte.
Adaptado de <https://ourworldindata.org/vaccine-preventable-diseases>.

En la actualidad no hay un calendario de vacunación universal respecto al número de dosis o al tipo de vacuna a utilizar. Sin embargo, los esquemas de vacunación contra pertussis que se emplean en los distintos países cumplen con las recomendaciones de la OMS de incluir una serie primaria de 3 dosis tanto con vacuna celular o acelular pediátrica, con la primera dosis administrada como mínimo a las 6 semanas de vida. Las dosis posteriores deben administrarse con un espaciamiento temporal mínimo de 4 a 8 semanas, a la edad de 10-14 semanas y de 14-18 semanas. La última dosis de la serie primaria recomendada debe completarse idealmente a los 6 meses. También se recomienda una dosis

de refuerzo para niños de 12 a 18 meses, preferiblemente antes del segundo año de vida, y debe administrarse ≥ 6 meses después de la última dosis primaria ¹⁵³. Un segundo refuerzo es recomendado para el ingreso escolar. Dado el costo de las vacunas acelulares, éstas, en general son empleadas en los países industrializados. Los países en vías de desarrollo emplean vacunas celulares para cubrir las necesidades de la población pediátrica, y acelulares para los refuerzos. En este punto es importante mencionar, nuevamente, que la OMS no recomienda el empleo de las vacunas celulares para la población mayor de 7 años de edad.

En los últimos años en varios países, pero particularmente en aquellos industrializados que emplean vacuna acelular para las dosis primarias, se ha reportado un aumento de casos de pertussis con un cambio en la distribución por edades hacia personas mayores (adolescentes y adultos jóvenes). Este cambio puede, en parte, explicarse por muchos de los factores que se han ido mencionando a lo largo de esta Introducción: mayor conciencia de la enfermedad y mejoras en las herramientas de

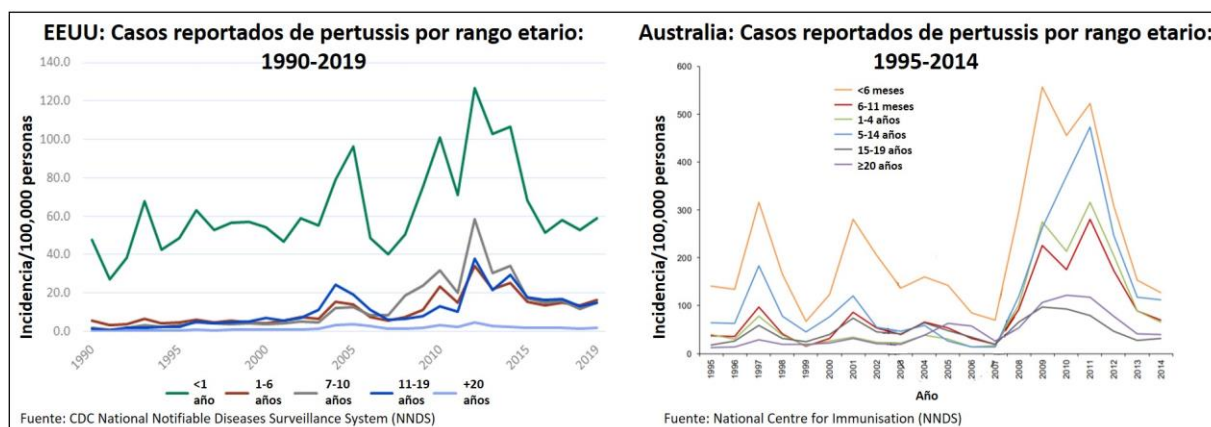


Representación 6. Número de casos de pertussis notificados en Estados Unidos a la CDC desde 1922 hasta 2019. Después de la introducción de las vacunas contra pertussis en la década de 1940, cuando el recuento de casos excedía con frecuencia los 100.000 casos por año, los informes disminuyeron drásticamente a menos de 10.000 en 1965. Durante la década de 1980, las notificaciones de pertussis comenzaron a aumentar gradualmente, y para 2019 se notificaron más de 18,000 casos en todo el país. Adaptado de cdc.gov.

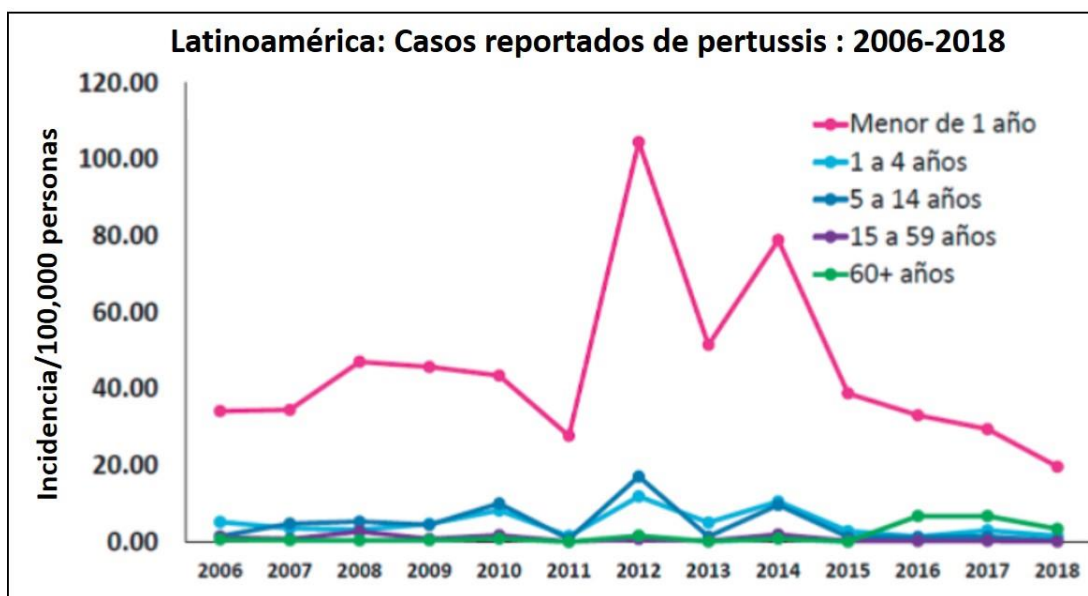
diagnóstico que han permitido la identificación de casos que previamente no eran detectados por los métodos de aislamiento en cultivo tradicionales ¹⁵⁴; pero también, por la pérdida de inmunidad inducida por vacunación, la transmisión desde personas que son asintomáticas y la evolución del agente causal hacia fenotipos más resistentes a la inmunidad conferida por las vacunas ¹⁵⁵.

Esta resurgencia de la enfermedad ha sido detectada en varios países independientemente de las diferencias en las estrategias de vigilancia que se adopten. En Estados Unidos, como en el resto de los países luego de la introducción de las primeras vacunas celulares en la década del 40, se detectó una clara reducción de los casos hasta la década del 90, que es cuando se registra un aumento sostenido de los casos (Representación 6).

Estados Unidos y Australia, entre otros países, detectaron brotes de envergadura en los años 2011-2012 de incidencias similares en los grupos poblacionales mayores de 1 año de edad. Si bien los menores de 1 año de edad continúan presentando la tasa de incidencia más alta, puede observarse que hay un aumento de casos en rangos etarios donde antes no había o había menos notificaciones (Representación 7). En Latinoamérica, también se detectó un brote de magnitud en el mismo período (Representación 8).



Representación 7. Incidencia de pertussis cada 100,000 habitantes reportada en Estados Unidos y Australia por grupo etario. Los bebés menores de 1 año, que tienen el mayor riesgo de padecer una enfermedad grave y muerte, continúan teniendo la tasa más alta de pertussis notificada. Adaptados de cdc.gov y health.gov.au.



Representación 8. Incidencia de pertussis en Latinoamérica entre 2006-2018. Fuente: Datos 2006-2018 del formulario conjunto para la notificación sobre inmunización de la OPS/OMS UNICEF, 2019.



Representación 9. Número de casos fatales en Argentina entre 1980 y 2017. Número de casos fatales diferenciados en azul oscuro los casos en menores de 1 año y en celeste el resto de las edades. Fuente: Ministerio de Salud de la Nación Argentina.

Finalmente, en Argentina también puede observarse un aumento en los casos fatales por pertussis en los últimos años (Representación 9).

En nuestro país, la inmunización contra pertussis que comenzó en los años 70 redujo drásticamente la incidencia de la enfermedad llevando la tasa de incidencia a 1,8 por 100.000 habitantes en el año 2003.

A partir de ese año, sin embargo, la tasa de incidencia de pertussis comenzó a incrementarse. En el año 2005, se detectó un brote con una tasa de notificación de 5,7 por 100.000 habitantes. Otro brote, pero de mayor envergadura se detectó en el año 2011 alcanzando un valor de 16/100.000 habitantes y en el 2012 la incidencia llegó a 37,1. En este brote se registró el mayor número de fallecimientos (n=76) asociados a la enfermedad. Todas las muertes ocurrieron en el grupo de menores de 1 año, exceptuando cinco casos que ocurrieron en el grupo de 1-4 años (n= 3), 25 a 34 años (n= 1) y mayor de 75 años (n= 1) ¹⁵⁶.

Esta situación epidemiológica ha obligado a los sistemas de salud a revisar sus estrategias de control para fortalecer y/o implementar medidas que en el corto plazo mejoren la situación de, al menos, la población más vulnerable. Así, como fue el caso de nuestro país y siguiendo recomendaciones de organismos internacionales, nuevos refuerzos vacunales se incorporaron a los calendarios de vacunación ⁷⁻¹⁰. Dentro de estas recomendaciones, se encuentra la aplicación de refuerzos sobre los grupos poblacionales que presentan las mayores tasas de incidencia (refuerzo en adolescentes y en adultos) y/o sobre los grupos poblacionales descritos como las principales fuentes de infección para los lactantes (personal de salud en contacto con los niños, miembros de familia en contacto con el menor y/o madres embarazadas). El número de refuerzos se incrementa año a año y esto conlleva a la necesidad de superar desafíos de costos y de implementación. El porqué de la necesidad de tantos refuerzos parece residir en las debilidades de las vacunas, en especial de las vacunas acelulares que, como se describe más adelante, confieren una inmunidad de corta duración ^{157,158}, presentan limitaciones en la protección contra la infección y la transmisión ^{159,160} y ejercen una mayor presión de selección sobre aislamientos bacterianos que evadirían más fácilmente la respuesta inmune inducida por la vacuna ^{161,162}.

Los recién nacidos están protegidos de muchas enfermedades infecciosas mediante la transferencia de anticuerpos maternos a través de la placenta y la lactancia. La introducción de la vacunación en embarazadas fue un éxito en todos los países donde la medida se llevó a cabo ¹⁶³⁻¹⁶⁷.

Cabe destacar en este aspecto que Argentina fue pionera en recomendar la implementación de la vacunación contra pertussis en embarazadas en el 2012, en incorporarla al calendario vacunal en el 2013 y en implementar la aplicación masiva desde el 2016, teniendo impactos positivos en las tasas de incidencia y de letalidad desde entonces ¹⁶⁴.

En este contexto epidemiológico, con la información sobre la evolución de *B. pertussis* en los últimos años y el avance en el conocimiento de los mecanismos inmunológicos característicos de cada tipo de vacuna, es que en el 2015, el Grupo Asesor Estratégico de Expertos en Inmunización expresó su preocupación por el resurgimiento de pertussis en ciertos países industrializados a pesar de la alta cobertura vacunal con la vacuna aP ¹⁶⁸. El cambio de wP a aP para la inmunización infantil primaria se propuso como, al menos parcialmente, responsable de ese resurgimiento. Por lo tanto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el artículo de posición que publica en agosto de 2015 recomienda a aquellos países que siguen usando la vacuna wP que no cambien su esquema primario a vacunas aP y que se apliquen refuerzos con aP a toda la sociedad ¹⁴⁰.

En los países que emplean vacuna celular y que detectaron incremento de casos, probablemente la principal causa que condujo a ello fue no tener las coberturas de vacunación adecuadas (>90%). En este sentido, es importante remarcar que la pandemia de COVID-19 y los esfuerzos para reducir la transmisión del SARS-CoV-2 afectaron sustancialmente a los servicios de salud en todo el mundo causando la disrupción global más grande y extendida de cobertura vacunal rutinaria de la historia reciente. A nivel global, en 2020, la cobertura de vacunación estimada fue del 76,7% para DTP3, lo que representa una reducción relativa del 7,7% en comparación con las dosis esperadas en ausencia de la pandemia. De enero a diciembre de 2020, se estima que 30 millones de niños omitieron alguna dosis de vacuna DTP3, lo que representaría 8,5 millones adicionales de niños no vacunados de forma rutinaria atribuible a la pandemia de COVID-19. Esto significaría que el mundo enfrentará mayores riesgos de enfermedades prevenibles por vacunación en años venideros ¹⁶⁹. Otro estudio reciente sugiere un posible aumento del 10% en la mortalidad por enfermedades prevenibles por vacunación como resultado de las interrupciones relacionadas con la pandemia en la inmunización de rutina y otras campañas de vacunación planificadas ¹⁷⁰. De hecho, ya hay un reporte que asocia la disminución de las dosis vacunales con el aumento de los casos de poliomielitis en países endémicos ¹⁷¹.

INMUNIDAD CONTRA PERTUSSIS: INFECCIÓN NATURAL Y VACUNAS COMERCIALES

Respecto de la inmunidad inducida por las vacunas en uso, es sabido que las vacunas comerciales basadas en células enteras de *B. pertussis* muertas por calor e inactivadas con agentes químicos (vacunas celulares o wP) y las acelulares basadas en antígenos purificados de la bacteria (vacunas acelulares o aP) generan respuestas inmunes humorales y celulares diferentes y distintivas^{172,173}. Esto es de esperarse si se tienen en cuenta las diferencias en la naturaleza de las mismas: las vacunas wP se componen de bacterias muertas por lo que presentan una amplia gama de antígenos y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que se unen a receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y pueden activar una amplia gama de receptores/sensores en las células inmunes innatas del hospedador. La vacuna wP es capaz, entonces, de generar un tipo de respuesta inmunológica de perfil mixto Th1/Th2/Th17, más potente en comparación con la generada por la vacuna aP y similar a la infección natural¹⁷⁴. Por otro lado, las vacunas aP, están compuestas de 3 a 5 antígenos de *B. pertussis* absorbidos en hidróxido de aluminio como adyuvante lo que induce un perfil de respuesta más de tipo Th2 y una mayor presión de selección en las cepas circulantes¹⁷⁴.

Construcción del marco teórico a partir del empleo de modelos animales

El conocimiento que actualmente se tiene sobre las respuestas inmunes que generan las distintas vacunas y la infección por *B. pertussis* se han logrado mayormente gracias al empleo de modelos animales y a la realización de numerosos estudios *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

La respuesta inmune innata juega un papel crucial en el control de las etapas iniciales de la infección por *B. pertussis* y además instruye a la respuesta adaptativa posterior¹⁷⁵. La bacteria se adhiere a las células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio superior^{82,176}, las cuales de por sí son una primera barrera al evitar la penetración de patógenos por entre sus uniones estrechas y mediante la producción de mucinas por parte de las células caliciformes secretoras. Dos tipos de células inmunes innatas residentes, las células dendríticas de la mucosa de las vías respiratorias (AMDC) y los macrófagos alveolares (AM), que están en estrecho contacto con el epitelio pulmonar, son las que median la primera respuesta celular contra *B. pertussis*. Las AMDC que se encuentran entre las células

epiteliales captan antígenos directamente de la luz de las vías respiratorias y migran luego al ganglio linfático drenante donde activan a los linfocitos T ^{177,178}. Los AM por su parte residen dentro de la capa mucosa y parecen ser importantes para la fagocitosis y muerte de *B. pertussis* ¹⁷⁹. En la Representación 10, se ilustra cómo estas células inmunes innatas residentes de pulmón proporcionan una primera línea de defensa contra la infección por *B. pertussis*, además de que inician y orquestan procesos complejos y altamente regulados que implican la activación y el reclutamiento de otras células inmunes y la generación de la inmunidad adaptativa de larga duración.

Históricamente, se consideró a *B. pertussis* como un patógeno extracelular que infecta el tracto respiratorio superior, pero se ha evidenciado que también es capaz de llegar a los pulmones y de sobrevivir dentro de células epiteliales respiratorias ciliadas y de macrófagos pulmonares ^{61,180,181}. El reconocimiento de los PAMPs de *B. pertussis* y sus factores de virulencia (incluidos el LOS, la ACT, la FHA y las lipoproteínas) por los PRRs expresados en macrófagos y DCs (y otras células del sistema inmune innato) conduce a la maduración de las mismas y producción de citoquinas y quimoquinas que median y regulan la respuesta inmune subsecuente. Se demostró que la PT puede operar como PAMP, activando la vía de señalización por TLR2 y TLR4 ^{182,183} estimulando la producción de IL-12 y actuar, así, como un adyuvante para promover la respuesta de perfil Th1 ¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. De manera más clásica, el LOS se une también a TLR4 dando como resultado la maduración de las DCs y la producción de IL-12 e IFN γ , citoquinas necesarias para el desarrollo de la respuesta Th1 protectora ¹⁸⁷. En estudios empleando ratones deficientes de TLR4, se logró demostrar que el curso de la infección por *B. pertussis* resulta más severo en comparación con lo observado en ratones wild type (WT) ¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. La activación de DCs por el LOS vía TLR4 también puede inducir la producción de IL-10 y, en consecuencia, generar células T reguladoras que secretan IL-10 (Tr1), lo que podría atenuar la respuesta Th1 y limitar así la patología pulmonar inflamatoria causada por *B. pertussis* ¹⁸⁷.

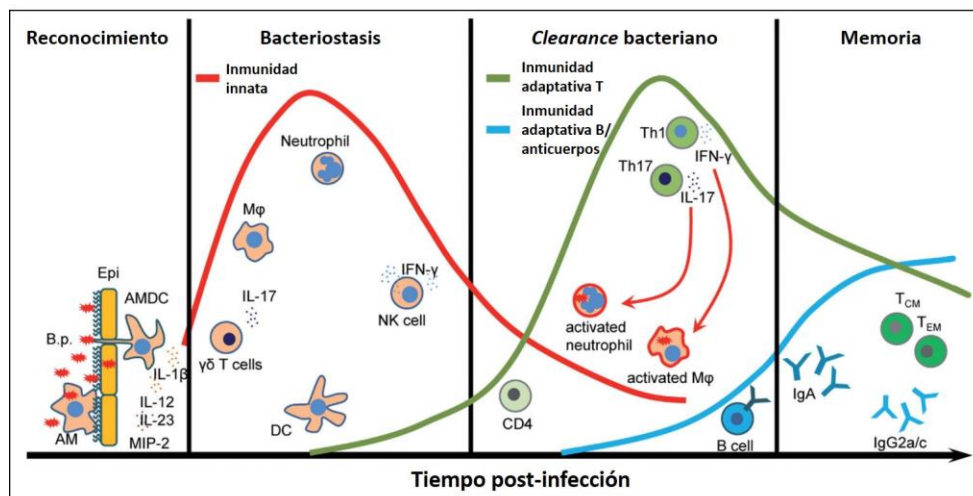
Las DCs también pueden activarse mediante el reconocimiento de otros factores de virulencia y toxinas de *B. pertussis* como es la ACT, la cual tendría un rol en la activación del inflamosoma NLRP3 y la Caspasa-1, lo que conduce a la producción de IL-1 β . Esta interleuquina junto a IL-23, promueven luego la expansión de las células Th17 murinas que ayudan a reclutar neutrófilos promoviendo la eliminación de *B. pertussis* ¹⁹¹. La toxina ACT también modula la señalización por TLR estimulando la producción de IL-10 y promoviendo el desarrollo de células Treg ¹⁹².

Posterior al reclutamiento inicial de DCs y macrófagos a los pulmones de ratones infectados con *B. pertussis*, se incorporan y/o expanden linfocitos $\gamma\delta$ y células NK. A las 2 hs post infección, las células $\gamma\delta$, predominantemente las $V\alpha 4-\gamma 1-$, producen IL-17 en los pulmones, la cual orquesta el reclutamiento de neutrófilos (importantes para el *clearance*) hacia los pulmones y la inducción de péptidos antimicrobianos^{193,194}. Esta IL-17 junto con CXCL2 (MIP-2) secretada por macrófagos activados y células epiteliales, mostraron ser necesarias además para la inducción de la respuesta Th1 y Th17 contra *B. pertussis*. De manera similar a los linfocitos $T\alpha\beta$, se reportó un segundo pico de linfocitos $\gamma\delta$ específicos contra *B. pertussis* en los pulmones entre 7 y 14 días después de la infección. Se observó que estas células $\gamma\delta$ pulmonares en ratones re infectados con *B. pertussis* son capaces de producir significativamente más IL-17 que las células $\gamma\delta$ de ratones primo infectados, característica típica de una respuesta de memoria¹⁹⁴. Efectivamente, estas células presentaron un fenotipo de células de memoria y de residencia de tejido (CD69+ CD103+) que se expandieron en los pulmones durante la infección con *B. pertussis* y proliferaron rápidamente después de la reexposición en ratones convalecientes¹⁹⁴, reconfirmando el lugar intermedio en el que se cataloga esta población celular entre la inmunidad innata y la adaptativa¹⁹⁵.

Durante una infección microbiana como la de *B. pertussis*, los neutrófilos poseen un papel crucial en la fagocitosis mediada por anticuerpos, la destrucción intracelular de bacterias patógenas y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)^{196,197}. Se demostró que la ACT puede inhibir la función de los neutrófilos, aunque sin afectar la inmunidad protectora contra *B. pertussis*^{197,198} mostrando la complejidad de la respuesta montada. Las células NK juegan un rol en la protección contra *B. pertussis* a través de la secreción de $IFN\gamma$, que mejora la actividad antimicrobiana de los macrófagos. La producción de $IFN\gamma$ por las células NK depende de la IL-12 secretada por las DCs activadas por *B. pertussis*. La depleción de las células NK en ratones infectados lleva a la diseminación de la bacteria desde el tracto respiratorio al hígado probablemente debido a una menor producción de $IFN\gamma$ y, por ende, una respuesta Th1 más débil¹⁹⁹. Más recientemente, se demostró *in vitro* que la infección con *B. pertussis* induce la activación del inflamosoma en macrófagos humanos y que la citoquina IL-18 producida por estas células activa a las células NK humanas, induciendo la producción de altas cantidades de $IFN\gamma$ y un aumento en la expresión de IL-2R α + y HLA-DR+²⁰⁰.

La respuesta inmune adaptativa en la infección por *B. pertussis* se desarrolla lentamente. Numerosos estudios han demostrado que los linfocitos $T\alpha\beta$ reclutados en el tracto respiratorio son los principales actores que median la eliminación de *B. pertussis*. Empleando el modelo murino se ha

evidenciado que las células T CD4 juegan un papel clave en la eliminación de la bacteria: la infección primaria con *B. pertussis* en ratones atímicos nu/nu, que carecen de células T, resulta en una infección persistente e incluso letal¹⁷³. La transferencia adoptiva de linfocitos T inmunes esplénicos a ratones atímicos revirtió la infección crónica y dio como resultado la eliminación bacteriana. De manera similar, la transferencia de células T CD4 específicas de *B. pertussis* a ratones BALB/c naive inmunosuprimidos (por irradiación subletal) antes de la infección dio como resultado el *clearance* de la bacteria. Por el contrario, los ratones irradiados subletalmente no pudieron eliminar la infección primaria después de la transferencia de células T CD8 específicas de *B. pertussis*¹⁷³. Además, las células T CD4 específicas de antígeno de ratones infectados producen IFN γ y/o IL-17, pero no citoquinas de tipo Th2, lo que sugiere que las células Th1 y Th17 están implicadas en la inmunidad protectora frente a la infección por *B. pertussis*. Ensayos en ratones IFN γ ^{-/-} presentaron una menor capacidad de eliminar el patógeno de los pulmones en comparación con la cepa WT²⁰¹, mientras que los ratones IFN γ R^{-/-} desarrollaron una infección diseminada fatal. De todas formas, algunos ratones IFN γ R^{-/-} sobreviven a la infección inicial sin desarrollar respuesta Th1 ni Th2, lo que sugirió que las células Th17 podrían estar implicadas en la protección contra *B. pertussis*²⁰². Ensayos posteriores en ratones IL-17^{-/-} infectados con *B. pertussis* mostraron una carga bacteriana significativamente mayor en comparación con los ratones WT¹⁷². Esta disminución en la capacidad de eliminar el patógeno de los ratones deficientes en IL-17 se correlacionó con una disminución significativa en la población de neutrófilos en los pulmones durante el curso de la infección¹⁷². En conjunto, los estudios publicados demuestran que las células Th1 y Th17 contribuyen a la inmunidad protectora inducida por la infección primaria por *B. pertussis* en ratones (Representación 10).



Representación 10. Contribución relativa de distintas células inmunes en la inducción de la respuesta a la infección con *B. pertussis*. Adaptado de Brummelman et al. 2015.

El número de linfocitos B aumenta significativamente en los pulmones durante el curso de la infección por *B. pertussis* y alcanza el número más alto cuando la infección casi ha desaparecido¹⁷⁴. De manera similar, los anticuerpos IgG específicos de *B. pertussis* solo son detectables en el suero en niveles significativos cuando el patógeno casi es eliminado de los pulmones^{173,203}. También se detectó IgA en los pulmones dos semanas después de la exposición a la bacteria¹⁷³. Esto sugiere que los anticuerpos IgG no juegan un papel importante en la eliminación de una infección natural primaria, pero pueden ser importantes en la inmunidad adaptativa inducida por una infección o vacunación previa. Otro estudio demostró que los linfocitos B pueden contribuir a la inmunidad protectora mediante mecanismos diferentes a los de la producción de anticuerpos específicos: ratones Ig^{-/-} infectados con *B. pertussis* desarrollaron una infección crónica y no fueron capaces de eliminar el patógeno, pero tampoco poseían células B maduras y no generaron una respuesta eficaz de linfocitos T específica de *B. pertussis*²⁰². Esto indicaría que las células B podrían actuar como células presentadoras de antígeno contribuyendo a la inducción de linfocitos T CD4 de memoria^{204,205}.

Los estudios en ratones convalecientes que han mostrado que la eliminación de las bacterias de los pulmones ocurre a los 3-7 días después de la reinfección¹⁷³, junto a los ensayos en el modelo babuino, donde individuos recuperados de una infección por *B. pertussis* están protegidos de la enfermedad y no transmiten el patógeno tras la exposición posterior, han mostrado el rol clave de la respuesta celular Th1/Th17 mixta de larga duración^{160,206}.

Respecto de la inmunidad inducida por vacunación, la respuesta a la vacuna aP mostró ser efectiva frente a los síntomas clínicos de pertussis, pero a diferencia de la inmunidad generada por la vacuna wP, dicha respuesta no fue efectiva contra la colonización y transmisión de *B. pertussis*, además de ser menos duradera¹⁶⁰. La reducida gama antigénica, entre otras características de la vacuna aP pueden explicar estas diferencias. En primer lugar, la respuesta de linfocitos T inducida por aP tiene un perfil funcional distinto en comparación con el inducido por las vacunas wP, como lo demuestran las respuestas tanto humorales como mediadas por células. Si bien los dos tipos de vacunas inducen niveles significativos de anticuerpos IgG específicos de *B. pertussis*²⁰⁷⁻²⁰⁹, hay una diferencia en los patrones de cambio de isotipo. En ratones, las vacunas aP inducen predominantemente anticuerpos de la subclase IgG1^{208,210}, lo cual refleja la inducción de una respuesta de tipo Th2, mientras que las vacunas wP inducen predominantemente IgG2a/b/c, como así también IgG1 e IgG3²⁰⁹, lo cual es consistente con la fuerte inducción del perfil Th1. Además, los anticuerpos generados por la vacuna wP

mostraron una mayor capacidad de inhibir la adhesión a células epiteliales que los generados por aP²¹¹.

Los estudios en modelos murinos sobre la inmunidad protectora anti-pertussis que se centran en la respuesta de linfocitos T CD4 y su perfil de secreción de citoquinas mostraron que, la vacunación con aP se asocia a la producción de IL-4, IL-5 e IL-17 por parte de los mismos^{172,210}, lo que representa una respuesta mixta Th2/Th17. Por el contrario, las vacunas wP inducen una respuesta mixta de secreción de IFN γ e IL-17, es decir, correspondientes a un perfil Th1/Th17¹⁷². Los estudios en ratones deficientes en citoquinas han demostrado que la protección contra *B. pertussis* inducida por la inmunización con la vacuna aP es tan eficaz en ratones IL-4^{-/-} o IFN γ ^{-/-} como en ratones WT, mientras que la protección se ve significativamente disminuida en ratones IL-17A^{-/-}¹⁷². Esto indica que las células Th17 juegan un papel esencial en la respuesta inmune celular protectora inducida por la vacuna aP, mientras que las células Th2 no contribuyen a la misma. Por el contrario, los linfocitos Th1 son necesarios para la protección inducida con vacunas wP en el modelo murino¹⁷². En el modelo babuino, la inmunización con una vacuna aP, que confiere protección contra la enfermedad, pero no contra la infección o la transmisión, induce una respuesta mixta de células T CD4 de tipo Th1/Th2. Por el contrario, la vacunación con wP, que genera protección contra la colonización y la transmisión, induce una respuesta de memoria mixta Th1/Th17¹⁶⁰, lo que sugiere que tanto las células Th1 como las Th17 son importantes en la prevención de la colonización por *B. pertussis* en este modelo.

Estudios más recientes relacionados a la memoria inmunológica han demostrado que tanto la infección natural como la vacunación con wP generan poblaciones de linfocitos T CD4 de memoria tejido residente (Trm) de pulmón y específicas contra *B. pertussis*, que se expanden frente a la reinfección o infección pulmonar, respectivamente, y son suficientes para el *clearance* bacteriano en pulmón. Éstas poblaciones tienen un perfil Th1/Th17²¹². Las mismas poblaciones se encontraron en cavidad nasal, siendo específicamente la población CD4 Trm IL-17+, crucial para la inmunidad esterilizante en dicho tejido. Estas células serían las responsables de evitar la transmisión asintomática de pertussis. De hecho, el número de células CD4 Trm IL-17+ correlaciona con la protección contra la colonización nasal en el modelo murino²¹³. Estas poblaciones no se generan en respuesta a la vacunación con aP, hecho que podría parcialmente explicarse porque dosis altas de antígenos y adyuvante (como es el caso de las vacunas aP) pueden inducir una inmunidad vigorosa a corto plazo y en simultáneo agotar al sistema inmunológico e impedir la inmunidad a largo plazo²¹⁴⁻²¹⁷.

Resumiendo, la infección natural y en menor medida la inmunización con wP, inducen una protección inmunitaria fuerte y persistente contra la reinfección y colonización por *B. pertussis*, aunque no es una inmunidad de por vida. Mientras que la vacuna aP previene la enfermedad, no evita la colonización y, por ende, transmisión de este patógeno.

En general y como veremos en la sección siguiente, los estudios en humanos son consistentes con los datos de modelos animales en cuanto a la dominancia del perfil Th2 asociada a la vacunación con aP y del perfil mixto Th1/Th17 después de la vacunación con wP.

Construcción del marco teórico a partir de la infección natural y la vacunación en el humano

La infección natural por pertussis lleva a que entre un 80-85% de los pacientes seroconvirtan respecto de los niveles de anticuerpos contra PT. Lo mismo sucede luego de la vacunación, sin embargo, a diferencia de otras enfermedades, este incremento no presenta una correlación de protección²¹⁸⁻²²². De hecho, hasta la fecha, no se ha identificado una clara correlación de protección (CoP) contra la enfermedad que sea fácil de medir^{223,224}. De todas formas, hay evidencia de que la calidad de anticuerpos y la especificidad de los mismos contra ciertos antígenos de *B. pertussis*, son características relevantes para la protección^{225,226}. Se sabe también que el papel de la inmunidad mediada por células en humanos es esencial para la resolución de la infección y en la inmunidad protectora de memoria a largo plazo^{96,227,228}. Se demostró que la infección natural por *B. pertussis* genera una respuesta celular de perfil Th1 en niños infectados o convalecientes²²⁹. Por otro lado, como hemos comentado, los dos tipos de vacunas comerciales son eficaces para prevenir la enfermedad en infantes^{62,230} pero cada una con un perfil de respuesta inmune particular, y por lo tanto, mecanismo de protección característico. Si bien es difícil comparar formalmente la respuesta de los linfocitos T en diferentes estudios clínicos debido a las diferencias en cómo se miden las respuestas celulares, los estudios en humanos, en general, han confirmado las mismas observaciones que en el modelo murino: las vacunas acelulares inducen una respuesta T CD4 Th2 dominante, aunque mixta Th2/Th1/Th17 en niños pequeños²³¹⁻²³⁴. Y la vacuna celular, por el contrario, induce una respuesta de células T CD4 de tipo Th1/Th17, similar a la observada después de una infección natural^{172,231,233,235-238}. La serie primaria con vacunas celulares o

acelulares genera diferencias en la calidad, cantidad, longevidad y capacidad de potenciar la memoria inmunológica, siendo las vacunas celulares más potentes a corto y largo plazo que las acelulares ^{239–242}.

Medir la eficacia de las vacunas contra pertussis no es sencillo ya que hay muchos factores que impactan sobre el valor de la misma: la definición de caso, la edad del individuo en el momento de la vacunación, el entorno de exposición a *Bordetella* sp circulante, el tiempo transcurrido desde la última dosis y las características de la vacuna que se administra ²⁴³. Lo mismo sucede con la duración de la protección después de la vacunación, la cual también depende del tipo de vacuna, el calendario vacunal, el nivel de exposición y la edad de la primera inmunización ^{242,244–248}. Durante el primer año después de la vacunación, se estima que la eficacia de una dosis de cualquiera de las dos vacunas es del 100% contra la enfermedad fatal o grave, del 90% contra la enfermedad típica y solo del 70% contra la enfermedad leve ^{249–251}. De todas formas, la inmunidad generada por cualquiera de las vacunas e incluso por la infección natural, disminuye con el tiempo y en ningún caso se genera inmunidad de por vida ^{51,247}. Se estima que después de la infección, la inmunidad dura entre 7 y 20 años y después de la vacunación, entre 4 y 12 años ^{247,252,253}.

Los niños que reciben la primera inmunización con la vacuna celular y luego reciben un refuerzo con la vacuna acelular parecen tener los mejores niveles de protección ^{254,255}. Esto se debe a que la impronta inmunológica que genera la vacunación primaria afecta la respuesta a la vacunación de refuerzo posterior ^{255–258}.

La introducción de dosis de refuerzo adicionales con la vacuna aP fue una medida que se llevó a cabo para intentar mitigar el problema de la rápida pérdida de inmunidad ^{7–10} pero, lamentablemente, esta intervención sanitaria no ha tenido el éxito que se esperaba ^{259,260}.

Por todo lo aquí planteado y acorde al artículo de posición de la OMS, ¹⁴⁰ la comunidad científica experta en pertussis llegó a un acuerdo en cuanto a la necesidad de nuevas formulaciones vacunales superadoras a las actualmente disponibles. Varios son los candidatos vacunales que están en estadios avanzados de desarrollo, los cuales se describen en la siguiente sección.

NUEVAS VACUNAS CONTRA PERTUSSIS

Como se mencionó con anterioridad, no existe un correlato de protección para esta enfermedad, lo que hace que el desarrollo de nuevas vacunas contra pertussis no sea una tarea sencilla. Se ha profundizado mucho en la caracterización de la respuesta inmune protectora “deseada” en modelos animales y se han obtenido algunos datos de estudios en humanos también. En términos generales la comunidad científica concuerda que una respuesta de anticuerpos de calidad, de células efectoras Th1 y Th17 y de memoria residente en tejidos, con niveles de seguridad garantizados, es el modelo de respuesta inmune que el nuevo o los nuevos candidatos vacunales debieran generar ^{11,12,22,261,262}.

En esta sección vamos a describir los nuevos avances en el desarrollo de vacunas contra pertussis, pero nos parece muy importante recalcar que mientras nuevas formulaciones vacunales se desarrollan, las comerciales actuales deben seguir aplicándose, se deben mantener las coberturas por encima del 90 % y la vigilancia de pertussis debe intensificarse en pos de evitar que la situación empeore.

Candidato vacunal a bacteria viva atenuada de administración intranasal

El candidato vacunal en estadio más avanzado de desarrollo que ha comenzado la fase de estudios clínicos en humanos es el que se basa en una cepa de *B. pertussis* viva atenuada (BPZE1). Esta formulación vacunal se demostró inmunogénica y protectora en ratones y babuinos luego de su administración intranasal ¹³⁻¹⁹. En el modelo murino, una única dosis nasal de BPZE1, a diferencia de una dosis alta de la vacuna aP comercial, indujo la secreción de IgA específica de *B. pertussis* en la cavidad nasal ²⁰. También se demostró que esta vacuna es capaz de inducir linfocitos CD4+ CD69+ CD103+ de memoria secretores de IL-17, residente en tejido pulmonar y en la mucosa nasofaríngea de los ratones. También en humanos, al ser administrada por vía mucosal y colonizar la nasofaringe del individuo, esta vacuna induce una fuerte, amplia y prolongada inmunidad mucosal y sistémica. Actualmente, se estudia en *trials* clínicos como una vacuna de refuerzo en adolescentes/adultos. Los primeros ensayos clínicos han mostrado que la vacuna es segura, inmunogénica e induce una amplia respuesta de anticuerpos contra PT, FHA, PRN y fimbrias después una sola dosis nasal ²¹. Este candidato vacunal se encuentra actualmente en un ensayo clínico de fase IIb.

Nuevas vacunas celulares menos reactogénicas

Teniendo en cuenta que la principal causa de los efectos adversos de la vacuna wP está asociada a la endotoxina de *B. pertussis* que es un lipooligosacárido (LOS) pentaacilado, investigadores del Instituto Butantan en São Paulo, Brasil, disminuyeron la endotoxicidad de la vacuna realizando una extracción química del LOS de la membrana externa ²². Esta extracción resultó en una disminución significativa del contenido de endotoxinas sin afectar la integridad del producto. Otros investigadores diseñaron cepas de *B. pertussis* con el lípido A alterado mediante la expresión de genes de aciltransferasas LpxA, LpxD y LpxL de otras bacterias dando como resultado una menor endotoxicidad ²³.

Nuevas vacunas acelulares con PT genéticamente inactivada

Hace ya tiempo atrás se logró tener evidencia sobre la seguridad y capacidad de inducir una respuesta inmune robusta empleando formulaciones que contienen una PT genéticamente modificada (rPT) ^{263,264}. Con este antecedente, la compañía farmacéutica BioNetAsia desarrolló una nueva cepa de *B. pertussis* que expresa rPT ²⁶⁵. Esta cepa produjo mayores cantidades de rPT en comparación con la cepa WT, y formulaciones conteniendo dicha toxina purificada no indujeron reacciones adversas de consideración ²⁶⁵. Bionet entonces formuló una nueva vacuna acelular conteniendo rPT, FHA y PRN en combinación o no con los toxoides tetánico y diftérico. Los resultados del primer estudio clínico en humanos adultos mostraron que tiene una reactogenicidad y perfil de seguridad similares a la vacuna acelular Adacel®, una buena inmunogenicidad ²⁶⁶ y una respuesta de memoria a largo plazo superior en comparación a las vacunas acelulares actuales ²⁴. Este nuevo candidato podría superar una de las debilidades de las vacunas acelulares actuales que es la pérdida rápida de inmunidad. Queda aún demostrar la capacidad de protección frente a cepas circulantes actuales y sortear la cuestión de la presión de selección que este tipo de vacuna ejercería sobre la población bacteriana en circulación.

Nuevos antígenos y adyuvantes para adicionar a formulaciones aP

Desde hace tiempo se ha explorado la incorporación y búsqueda de nuevos antígenos protectores derivados de *B. pertussis* para mejorar las vacunas aP actuales. La ACT²⁵, la proteína autotransportadora de resistencia al suero BrkA²⁶ y la proteína reguladora de hierro²⁷ entre otros, se han propuesto como antígenos protectores. Aunque ninguno de estos antígenos por sí solos ofreció una protección significativa contra *B. pertussis* en el modelo murino de infección intranasal, cuando se combinaron con la vacuna aP, confirieron una mejor protección en comparación con la administración de la vacuna aP sola.

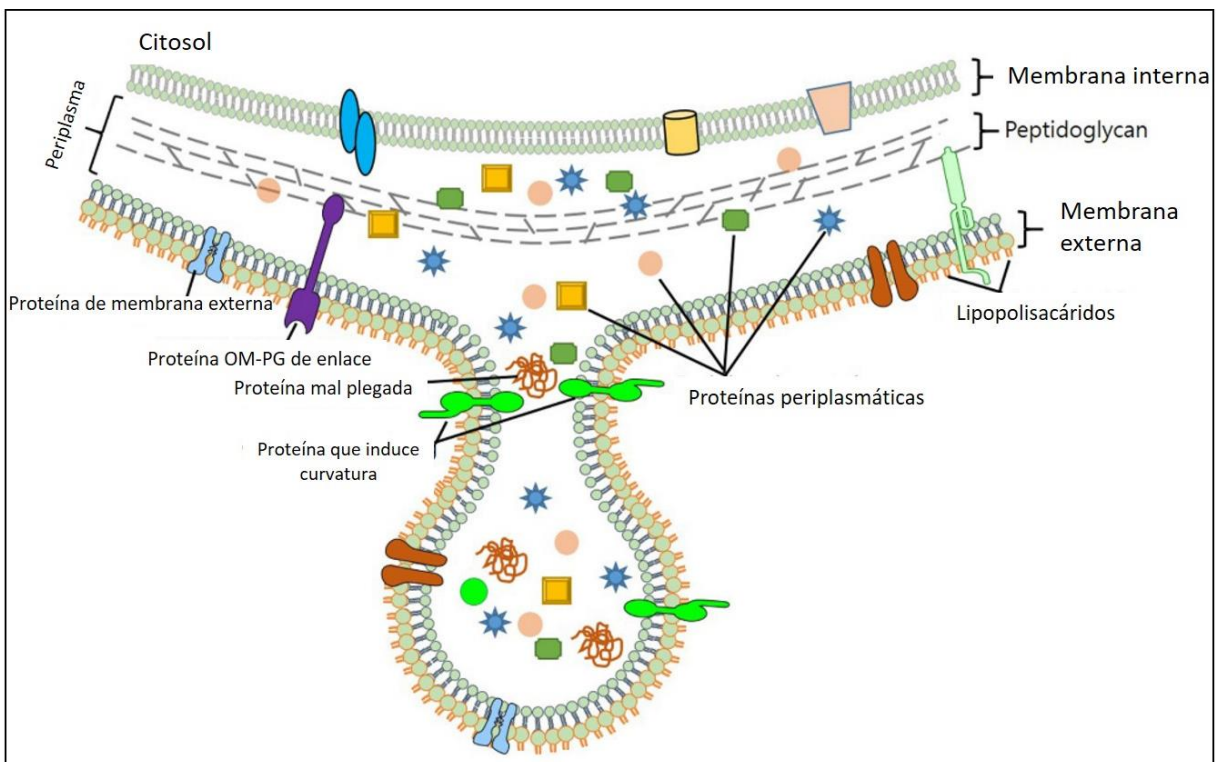
La mejora de las vacunas acelulares también podría lograrse mediante el uso de nuevos adyuvantes. Los adyuvantes son componentes de las vacunas que mejoran la magnitud, amplitud y durabilidad de la respuesta inmune. Después de su introducción en la década de 1920, el hidróxido de aluminio siguió siendo el único adyuvante licenciado para uso humano durante los siguientes 70 años. Desde la década de 1990, otros cinco adyuvantes se han incluido en vacunas autorizadas, pero los mecanismos moleculares de cómo funcionan son parcialmente comprendidos. En este último tiempo el avance en el conocimiento de la activación del sistema inmune innato a través de los PRRs ha mejorado la comprensión de cómo actúan los adyuvantes y ha permitido avances en este campo²⁶⁷. La combinación de la vacuna aP con adyuvantes que puedan instruir un perfil de respuesta Th1 y Th17 de memoria sería una opción prometedora que mejoraría la protección inducida por la misma. Algunos adyuvantes ya ensayados en combinación con aP mostraron incrementar la potencia de la inmunidad con un perfil Th1. Entre otros, las emulsiones de MF59 y la combinación de hidróxido de aluminio con el monofosforil lípido A (MPLA) (agonista de TLR4, pero menos endotóxico), han resultado en una respuesta inmune superadora a la generada por la vacuna aP sola²⁸. Otro grupo realizó estudios usando la vacuna aP sola o en combinación con MPLA o con LpxL2 (LPS de *Neisseria meningitidis* menos endotóxico). Los resultados mostraron una menor colonización de *B. pertussis* y mayor respuesta de anticuerpos IgG séricos específicos contra PT en aquellos grupos experimentales inmunizados con las combinaciones en comparación a la administración de aP sola²⁶⁸.

Por último, otro grupo de investigadores usó la vacuna aP en combinación con di-GMP cíclico (agonista de STING) y LP1569, una proteína de *B. pertussis* agonista de TLR2. Esta combinación indujo una producción sinérgica de IFN- β , IL-12 e IL-23. La inmunización parenteral de ratones con esta vacuna experimental indujo una respuesta Th1 y Th17 y confirió protección contra la infección pulmonar con

B. pertussis^{269,270}. El mismo grupo, demostró que una formulación con la vacuna aP más un nuevo adyuvante agonista de TLR7 (TLR7a) adsorbido en hidróxido de aluminio mejora la respuesta Th1 y Th17 específica de *B. pertussis* e induce mayores niveles de anticuerpos IgG2a/b séricos (que presentan una mejor funcionalidad que los inducidos por la aP formulada con hidróxido de aluminio sola). Además, la adición de un ligando TLR7 mejoró la eficacia protectora de la vacuna aP contra la infección por aerosoles de *B. pertussis*, siendo la protección comparable a la de una vacuna wP²⁹.

Vesículas de membrana externa (OMVs) de *B. pertussis* como candidato vacunal

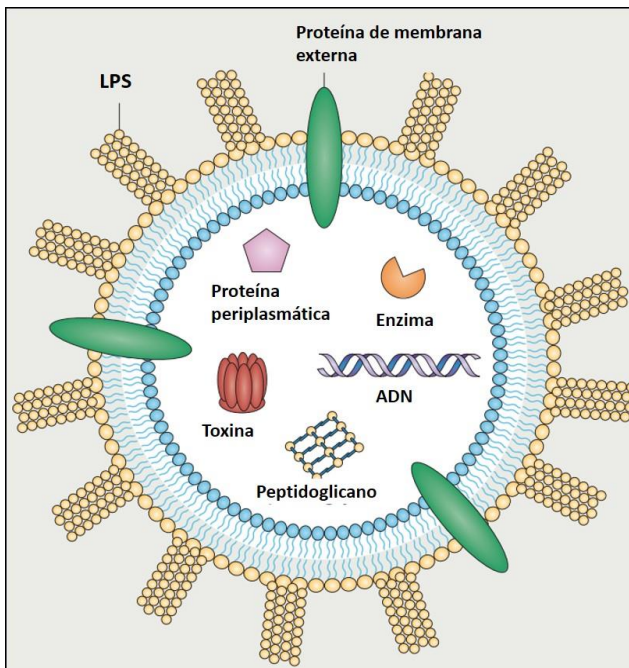
No hace mucho tiempo que se tiene el conocimiento de que todas las bacterias Gram-negativas son capaces de liberar naturalmente estructuras esféricas de entre 50 y 250 nm denominadas vesículas de membrana externa (OMVs por sus siglas en inglés) (Representación 11). Inicialmente se creía que la formación de OMVs era simplemente un subproducto del crecimiento bacteriano, sin embargo,



Representación 11. Biogénesis de la producción de OMV en bacterias y su carga con componentes de la membrana externa y del espacio periplásmico. Adaptado de Jan AT 2017.

estudios de la última década han revelado que las OMVs pueden tener diversas funciones: transporte de factores de virulencia, transferencia de ADN, intercepción de bacteriófagos, antibióticos y factores de defensa del hospedador eucariota, desintoxicación celular y comunicación intra- e inter-especie. También se ha demostrado que tanto las bacterias patógenas como las comensales pueden utilizar las OMVs para manipular la respuesta inmune del hospedador²⁷¹⁻²⁷⁴. Incluso se ha propuesto que el origen evolutivo del complejo y sofisticado sistema de endomembranas eucariota se originó a partir de OMVs bacterianas liberadas por la mitocondria ancestral dentro del citosol de su hospedador de origen arqueal²⁷⁵.

Las OMVs entonces contienen de forma natural varios antígenos y moléculas inmunoestimuladoras nativas expuestas en la superficie y en su interior (Representación 12). Basados en el conocimiento de las características estructurales de las OMVs y teniendo en cuenta el ejemplo



Representación 12. Estructura y contenido de las OMVs. Adaptado de Kaparakis-Liaskos & Ferrero 2015.

exitoso de vacunas a OMVs derivadas *Neisseria meningitidis* serogrupo B, nuestro grupo de investigación, cuando todavía no se contaba con el conocimiento actual de estas estructuras, trabajó pioneramente en estudios que buscaban evidenciar su presencia en cultivos de *B. pertussis*²⁷⁶ y luego en evaluar el potencial de las OMVs derivadas de *B. pertussis* (BpOMVs) como candidatas a vacuna contra pertussis^{30,277}. Caracterizamos la composición de las nanopartículas en más de 200 componentes proteicos, incluidos los factores de virulencia PT, PRN, fimbrias, FHA y ACT²⁷⁸. Nuestra vacuna basada en BpOMVs y formulada de manera idéntica a la vacuna aP actual en

términos de los toxoides diftérico y tetánico, y el adyuvante hidróxido de aluminio, mostró ser segura³² y con una capacidad de protección efectiva en prevenir la infección contra diversas cepas de *B. pertussis*, incluidas las que no expresan el antígeno PRN^{31,33}. Todo el trabajo realizado y divulgado en numerosas publicaciones y en una patente que ya ha sido aprobada en Estado Unidos, ha permitido

demostrar de forma robusta que las BpOMVs poseen características que las muestran como un candidato vacunal acelular contra pertussis superador^{30,277-279}. No solo por su seguridad y capacidad de inducir protección a través de una respuesta de perfil Th1, Th17 y Trm de pulmón, sino también porque contiene un gran número de inmunógenos en conformaciones similares a las que se encuentran en la bacteria, que, en comparación con las vacunas aP actuales, evitaría la alta presión de selección conferida por uno o unos pocos antígenos protectores de la vacuna²⁷⁸.

Por todo lo presentado en relación a seguridad, multiantigenicidad, amplio espectro de protección y tipo de perfil inmune es que la formulación vacunal con BpOMVs tiene el potencial de reemplazar a las vacunas acelulares actuales.

Continuar profundizando en los mecanismos por los cuales nuestro candidato vacunal confiere protección es importante para seguir avanzando en el recorrido de posicionamiento del mismo hacia una factible aplicación en humanos y poder aseverar si realmente puede contribuir a combatir la resurgencia de este patógeno y sus implicancias. Es por eso que nos propusimos los objetivos generales y específicos presentados más adelante.

A continuación, presentaré el contexto de la otra problemática de salud sobre la que trabajé durante mi tesis doctoral luego de haber adquirido experiencia en pertussis.

PANDEMIA COVID-19

Hasta el 20 de febrero de 2022, han sido confirmados 421 millones de casos (Representación 13) y 6 millones de muertes asociadas a COVID-19 en todo el mundo (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>).

El 11 de marzo del año 2020 la OMS declara como pandemia a la enfermedad COVID-19 causada por el virus SARS-CoV-2 (<https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>). Esta situación sin precedentes para las generaciones actuales que habitamos este planeta puso en jaque no solo la economía, los sistemas de salud y políticos, sino que también puso de manifiesto la forma problemática en la que nos relacionamos con nuestro entorno²⁸⁰.

En Argentina en particular, el Aislamiento Social Preventivo Obligatorio (ASPO) se decreta el 20 de marzo de 2020, inhabilitando a toda persona que su actividad laboral no calificara de esencial a circular (<https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/decreto-297-2020-335741>).

En dicho contexto, muchos laboratorios de investigación dirigieron sus actividades en pos de contribuir a la atención de esta situación sanitaria crítica. Así el IIFP, como instituto de investigación en inmunología básica, focalizó sus actividades en diversos proyectos relacionados a la temática (siendo éstos considerados esenciales). Varios de estos proyectos siguen aún vigentes.

Como enfermedad emergente, eran y son diversos y numerosos los flancos por los que se podía intentar aportar soluciones o conocimientos. En base a mi experiencia previa y la de los distintos grupos de investigación del IIFP que participaron de los proyectos y a las oportunidades que se presentaron, junto al Dr. Martín Rumbo nos propusimos trabajar en los objetivos que se enuncian a continuación.



Representación 13. Incidencia global de casos de COVID-19. Fuente: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>

OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales de esta tesis son aportar desde la investigación inmunológica básica nuevos conocimientos que encaminen posibles soluciones a problemáticas de salud que hoy en día se consideran de gravedad y urgencia, como lo son la tos convulsa y la COVID-19.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- DEMOSTRAR LA RELEVANCIA DE LA LOCALIZACIÓN TEJIDO ESPECÍFICA DE LAS POBLACIONES CELULARES PROTECTORAS ANTI-PERTUSSIS INDUCIDAS POR LA INMUNIZACIÓN EN EL MODELO MURINO

- 1.1. Producir anticuerpos monoclonales depletantes anti CD4/CD8/B220.
- 1.2. Caracterizar del rol funcional sistémico de las poblaciones CD4/CD8/B220 en el contexto del modelo murino de protección.
- 1.3. Caracterizar del rol funcional local (pulmonar) de dichas poblaciones en el contexto del modelo murino de protección.

2- CARACTERIZAR LOS MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DEL INFLAMOSOMA DESENCADENADOS POR BpOMVs

- 2.1. Demostrar la capacidad de las BpOMVs de activar la vía innata del inflamósoma en distintas líneas celulares murinas y humanas.
- 2.2. Demostrar que las BpOMVs son señal 1 y 2 de activación del inflamósoma. Dependencia con el flujo de K⁺.
- 2.3. Demostrar la capacidad de las BpOMVs de activar la vía canónica del inflamósoma en BMDM murinos.

- 2.4. Demostrar la capacidad de las BpOMVs de activar la vía no canónica del inflamosoma en BMDM murinos y dilucidar el rol del BpLOS contenido en las BpOMVs de activar dicha vía.
- 2.5. Evidenciar diferencias especie específicas entre ratones y humanos en cuanto a reconocimiento del BpLOS contenido en las BpOMVs.
- 2.6. Demostrar la presencia de DNA en las BpOMVs y su rol en la activación de la vía canónica del inflamosoma por AIM2.
- 2.7. Demostrar la internalización de las BpOMVs en macrófagos murinos.

3- GENERAR ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-BpOMVs

- 3.1. Generar y caracterizar 2 hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-GroEL.
 - 3.1.1. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-GroEL: capacidad aglutinante.
 - 3.1.2. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-GroEL: capacidad protectora/opsonizante.
 - 3.1.3. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-GroEL: potencial uso para *tracking* intracelular.
 - 3.1.4. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-GroEL: potencial uso para cuantificación de OMVs.

4- REALIZAR UN APORTE EXPERIMENTAL A LA PANDEMIA CAUSADA POR EL VIRUS SARS-CoV-2

- 4.1. Generar y caracterizar anticuerpos monoclonales anti-proteínas RBD y N del virus SARS-CoV-2.
 - 4.1.1. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-RBD y anti-N: potencial uso en diagnóstico de COVID-19.
 - 4.1.2. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-RBD y anti-N: capacidad neutralizante.

- 4.2. Generar evidencia *in vitro* de la capacidad inmunomoduladora de la lidocaína de manera aditiva a la dexametasona, como posible reposicionamiento terapéutico para pacientes COVID-19 severos.
 - 4.2.1. Demostrar la capacidad de la lidocaína y la dexametasona de modular de manera aditiva distintas vías inflamatorias de señalización vía receptores Toll.
 - 4.2.2. Demostrar la capacidad de la lidocaína y la dexametasona de modular de manera aditiva la señalización inflamatoria por TNFR e IFNGR.
 - 4.2.3. Demostrar la capacidad de la lidocaína y la dexametasona de modular de manera aditiva la activación del factor de transcripción NF- κ B.
 - 4.2.4. Demostrar la capacidad de la lidocaína y la dexametasona de modular de manera aditiva la activación del inflamosoma.
 - 4.2.5. Evidenciar que la lidocaína y la dexametasona no modulan la vía protectora de IFNs de tipo I.
 - 4.2.6. Demostrar la capacidad de la lidocaína y la dexametasona de modular de manera aditiva la respuesta inflamatoria exacerbada en un contexto de infección *in vitro* por SARS-CoV-2.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

RELEVANCIA EN LA PROTECCIÓN ANTI-PERTUSSIS DE LAS POBLACIONES CELULARES TEJIDO ESPECÍFICA INDUCIDAS POR LA INMUNIZACIÓN EN EL MODELO MURINO

"Whoever walks a furlong without sympathy walks to his own funeral drest in his shroud."

Walt Whitman

Introducción

Han pasado más de 100 años desde que Bordet y Gengou identificaran a *Bordetella pertussis* como el agente causal de pertussis y, aún falta una comprensión completa de cómo la bacteria causa la enfermedad y de los mecanismos por los cuales la inmunidad del hospedador confiere protección frente a la infección o la vacunación. Los estudios realizados durante la era en donde sólo se empleaban vacunas celulares mostraron el rol de los anticuerpos, en particular contra las aglutininas, en la protección²⁸¹. Sin embargo, en los estudios clínicos de eficacia de las vacunas aP no se pudo demostrar la correlación entre la protección y los títulos de anticuerpos para ninguno de los antígenos de la vacuna²⁸². Como hemos mencionado en la introducción general de este trabajo de tesis, la evidencia de que los anticuerpos tienen un rol en la protección se obtuvo también a través de modelos animales^{167,283}.

Por otra parte, el papel directo de las células T CD4 en la eliminación bacteriana se demostró primeramente en el modelo murino mediante la transferencia de estas células a ratones inmunocomprometidos¹⁷³. Los resultados obtenidos sugieren que las células T CD4 contribuyen a la protección contra la colonización por *B. pertussis* a través de mecanismos dependientes de IFN γ . Los avances recientes en el estudio de la respuesta Th17 han ampliado nuestra comprensión de la respuesta inmune celular a la infección por *B. pertussis*. El modelo babuino proporcionó más evidencia de la relevancia de las respuestas Th1 y Th17 contra la infección y colonización por *B. pertussis*^{284,285}. Además del papel propuesto para las respuestas específicas de *B. pertussis* de IFN γ y/o IL-17 en la eliminación de las bacterias de las vías respiratorias, se ha demostrado que la inducción de células T de memoria residentes en tejido pulmonar productoras de IFN γ y/o IL-17 luego de la infección con *B. pertussis*, juegan un rol importante en la protección en el modelo murino²¹². Muchos de estos datos se fueron corroborando en estudios en humanos^{255,257}.

Si bien se ha avanzado en el conocimiento sobre los actores y mecanismos asociados a la protección contra pertussis, cuando se trabaja en el diseño de vacunas de próxima generación es importante reconocer que nuestra comprensión de la respuesta del hospedador a la infección y la vacunación es incompleta. Se necesitan esfuerzos continuos utilizando diversas y poderosas herramientas en el modelo murino y de ser posible en el modelo babuino, de forma de comprender los mecanismos subyacentes a la protección contra pertussis mediada por las vacunas.

En este contexto y con el objetivo de profundizar el rol protector de las poblaciones linfocitarias tanto sistémicas como locales en el contexto de vacunación anti-pertussis con nuestro candidato vacunal en el modelo murino, desarrollamos y aplicamos herramientas para poder llevar adelante el estudio de la funcionalidad de estas poblaciones. Los resultados alcanzados tanto sobre el desarrollo de herramientas como la aplicación de las mismas se muestran a continuación.

1.1. Producción de ascitis/anticuerpos monoclonales depletantes anti CD4, CD8 y B220.

Como hemos mencionado, la transferencia adoptiva de linfocitos T inmunes esplénicos específicos de *B. pertussis* a ratones atímicos han permitido detectar que las células T CD4 juegan un papel clave en la eliminación de la bacteria ¹⁷³. Otra aproximación posible para poner en relevancia las poblaciones celulares efectoras en la respuesta anti-pertussis es realizar ensayos *in vivo* de depleción de dichas poblaciones específicas. El mecanismo de depleción de células mediado por anticuerpos monoclonales es dependiente del receptor Fc y puede ser mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o fagocitosis ²⁸⁶.

Clon	Especie anticuerpo	Isotipo Anticuerpo	Especificidad de antígeno	Especie especificidad antígeno	Especie/cepa generación líquido ascítico	Volumen colecta total (aprox. en mL)	Concentración de proteínas (mg/mL)
GK1.5	Rata	IgG2b	CD4	Ratón	Ratón/Nude	90	61,2
53.6.72	Rata	IgG2a	CD8 α	Ratón	Ratón/Nude	65	23
RA3-6B2	Rata	IgG2a	CD45R/B220	Ratón	Ratón/Nude	55	28

Tabla 3. Características de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales depletantes y rendimiento de producción de ascitis en la cepa nude.

Pensando en esta última estrategia, durante mi trabajo de tesis, generamos anticuerpos monoclonales depletantes en líquido ascítico (ver Materiales y Métodos para detalles de protocolo) a partir de tres hibridomas productores de los mismos. En la Tabla 3 se muestran las características de los hibridomas productores de anticuerpos utilizados (clon GK1.5: rata anti ratón CD4, clon 53.6.72: rata anti ratón CD8 α y clon RA3-6B2: rata anti ratón CD45R/B220).

La producción de estos anticuerpos se llevó a cabo por inducción de tumores y líquido ascítico en ratones de la cepa nude (nu/nu). Las ascitis ricas en anticuerpos monoclonales se colectaron según se describió en la sección de Materiales y Métodos. Se determinó la concentración de proteínas por

BCA (Tabla 1) y se corrieron en un gel desnaturalizante SDS-PAGE 10% bis/acrilamida para confirmar la presencia de las cadenas liviana y pesada de los anticuerpos (Figura 1).

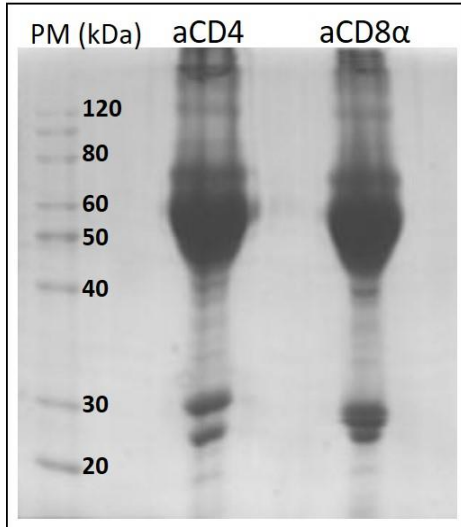


Figura 1. SDS-PAGE de las ascitis anti-CD4 y anti-CD8 α producidas en ratones nude. Gel 10% de bis/acrilamida teñido con Coomassie blue.

Con el líquido ascítico producido, realizamos la depleción sistémica (vía i.p.) con 100, 200 y 500 μ g. de proteína total en ratones

BALB/c. La capacidad depletante de los anticuerpos sobre las poblaciones de linfocitos CD4, CD8 y B220 fue caracterizada mediante citometría de flujo de esplenocitos y sangre periférica a las 24, 48 y 72 hs post inoculación i.p. del líquido ascítico correspondiente. En todas las condiciones y tiempos analizados observamos una disminución significativa de las poblaciones linfocitarias CD4, CD8 y B220 de manera similar en ambos compartimentos. A modo de ejemplo, en la Figura 2 se muestran Dot Plots representativos del análisis de depleción en esplenocitos (Figura 2A) y sangre periférica (Figura 2B) de ratones tratados vía i.p. con 200 μ g. de proteína total de ascitis anti-CD4 a las 24hs post inoculación. Los cuadrantes correspondientes a las poblaciones CD3+CD4+ (extremo derecho superior) disminuyen de 19,1% a 0,551% ($p < 0,0001$) y de 41,4% a 0,132% ($p < 0,0001$) para bazo y sangre respectivamente. Este análisis de depleción sistémica de células por citometría de flujo se realizó en todos los ensayos que se mencionan en el Capítulo. Los análisis de depleción se realizaron sobre células de sangre

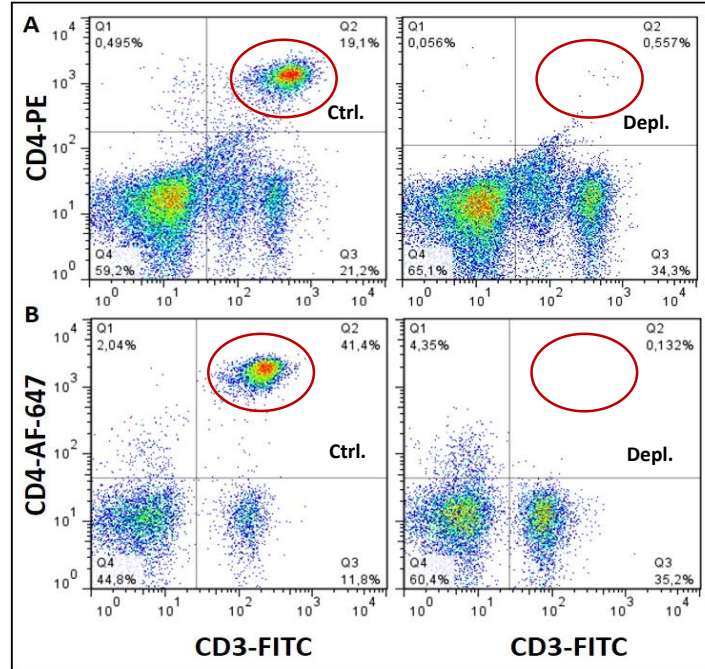


Figura 2. Depleción sistémica de linfocitos T CD4. Gráficos Dot Plot representativos del análisis por citometría de flujo de esplenocitos (A) y sangre periférica (B) de ratones naive inoculados i.p. con ascitis anti-CD4. Los paneles de la izquierda corresponden a individuos control (sin depletar) y los de la derecha a individuos depletados con ascitis anti-CD4.

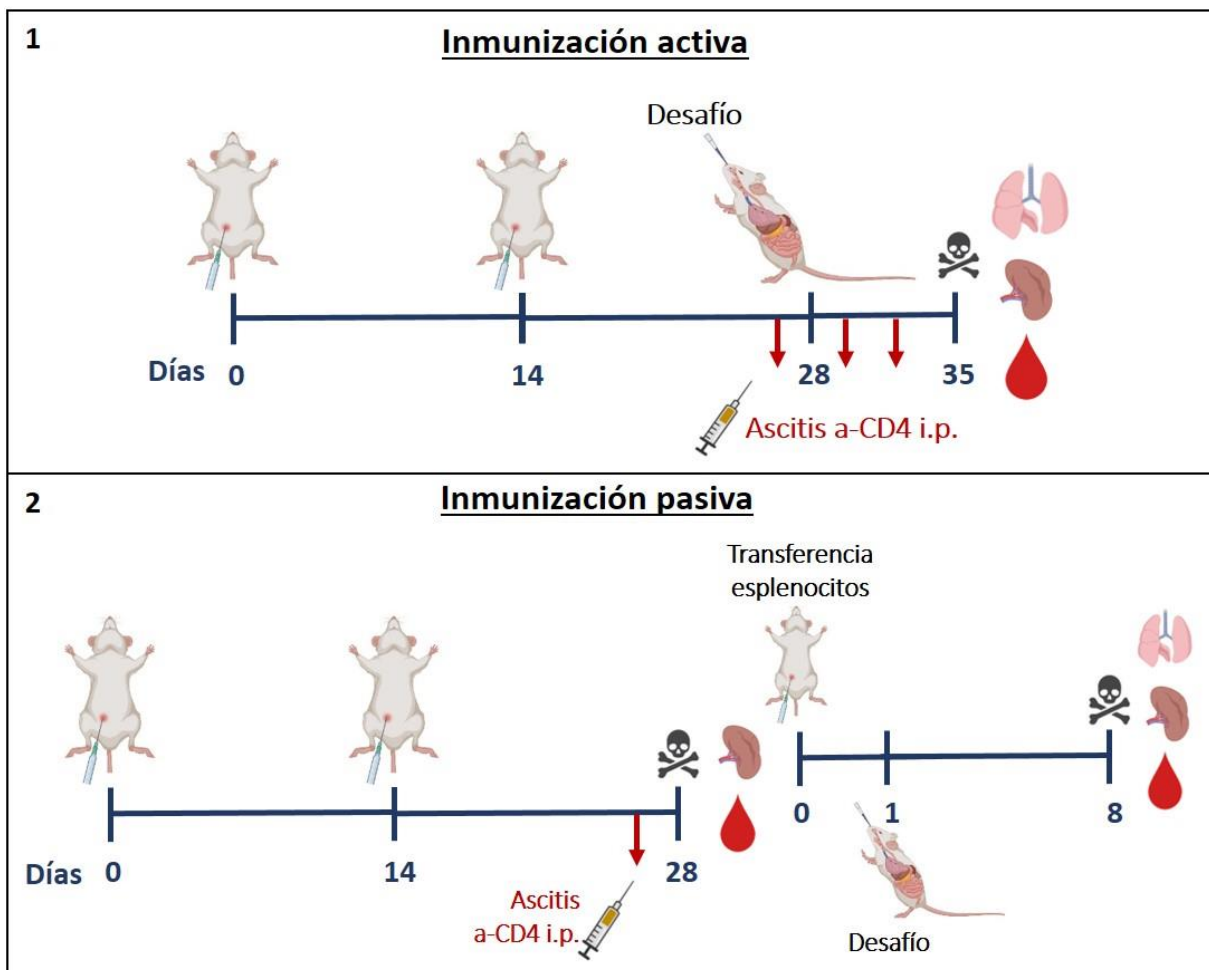
periférica obtenida de los animales vivos y sobre las células de bazo de los animales recientemente sacrificados. Una vez establecido el protocolo de depleción de las poblaciones, decidimos aplicarlo en el contexto de la inmunidad inducida por nuestro candidato vacunal (3 µg BpOMVs/dosis formulado con toxoides tetánico, diftérico e hidróxido de aluminio) en el modelo murino de protección anti-pertussis ampliamente usado^{32,109,287,288}. En dicho modelo se emplea un esquema de dos dosis i.p. espaciadas en 14 días y luego de 14 días post segunda dosis se realiza el desafío intranasal con una suspensión subletal de la cepa de referencia de *B. pertussis* TOH (Tohama I) de 1×10^7 UFC/mL en PBS previa anestesia inhalatoria con isofluorano. Siete días post desafío se sacrifican los animales y se disecan pulmones para recuento de UFC y/o bazo para ensayo de respuesta celular *in vitro* y/o análisis por citometría de flujo de poblaciones linfocitarias. El esquema de depleciones también lo empleamos en el modelo murino de protección pasiva transfiriendo células de un animal inmune hacia un animal naive. Para estos ensayos a los catorce días post segunda dosis se disecciona bazo y se realiza una suspensión de esplenocitos (transferencia de inmunidad celular), que luego se inocula por vía sistémica i.p. en ratones naive. A las 24 hs post inoculación, se realiza el desafío i.n. con una suspensión de *B. pertussis* TOH de 1×10^7 UFC/mL en PBS previa anestesia inhalatoria con isofluorano. Siete días post desafío se sacrifican los animales y se disecan pulmones para recuento de UFC y/o bazo para ensayo de respuesta celular *in vitro* y/o análisis por citometría de flujo de las poblaciones linfocitarias en bazo/pulmón. Las depleciones de poblaciones específicas con anticuerpos monoclonales se realizaron 24 hs antes y 24 y 72 hs después del desafío i.n en el caso de las inmunizaciones activas, y 24 hs antes del sacrificio para disección de bazo a transferir en la inmunización pasiva.

En los ensayos de este Capítulo se emplearon como controles las vacunas comerciales celular (wP) o acelular (aP), cuya composición, a excepción del componente pertussis, es similar. Cabe mencionar que no fue posible incluir ambas vacunas como control en todos los experimentos. Las razones de esta decisión se deben a que resultaba experimentalmente inviable y bioéticamente incorrecto dado el crecimiento exponencial del n de individuos con las condiciones a evaluar. Esto hizo que evaluemos la mejor estrategia experimental en base a la regla de las 3R.

A continuación, se describen los resultados de esta estrategia de depleción de poblaciones en el modelo murino de protección por *B. pertussis*.

1.2. Caracterización del rol funcional sistémico de las poblaciones CD4/CD8/B220 en el contexto del modelo murino de protección.

En el Esquema 1 se muestra la estrategia de depleción mencionada con 200 μ g. de proteína total de ascitis anti-CD4 vía i.p. 24 hs antes y 24 y 72 hs después del desafío intranasal en ratones naive o inmunizados con la vacuna comercial wP (inmunización activa). Siendo la vacuna wP la más robusta en cuanto a generación de respuesta inmune celular, decidimos emplearla como primera prueba de concepto. Paralelamente, y tal como se muestra en el Esquema 2, en otro grupo de ratones



*Esquemas de inmunización activa (Esquema 1) y pasiva (esquema 2), y desafío intranasal con *B. pertussis*. Esquemas de inmunización activa por inoculación i.p. de alguna de las vacunas (1) y pasiva por transferencia de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados (2) en ratones BALB/c naive. Al momento del sacrificio se diseccionan pulmones para recuento de UFC, bazo (para transferencia de células, respuesta celular o análisis por citometría de flujo) y se toma muestra de sangre para titular anticuerpos y para análisis de control de depleción por citometría de flujo.*

inmunizados con la vacuna wP, inoculamos ascitis anti-CD4 vía i.p. 13 días post segunda inmunización y al día 14 disecamos los bazo para realizar una suspensión celular de esplenocitos y transferirla vía i.p. a ratones naive a razón de 1bazo:1ratón (inmunización pasiva). Dos semanas post segunda dosis (esquema de inmunización activa) y 24 hs post transferencia de esplenocitos (esquema de inmunización pasiva) realizamos el desafío intranasal con *B. pertussis* TOH. Una semana post desafío, sacrificamos los animales, disecamos pulmones, homogenizamos en esterilidad, y plaqueamos distintas diluciones del homogenato pulmonar placas de Petri con BGA-sangre (Bordet-Gengou Agar suplementado con sangre de carnero al 15%). Realizamos el recuento de UFC entre 3 y 5 días post plaqueo. Los resultados alcanzados mostraron que tanto en la inmunización activa como la pasiva, los recuentos de UFC de los grupos inmunizados e inmunizados y depletados no mostraron diferencias significativas (Figura 3A y B). Este resultado indicaría en principio que la depleción sistémica de linfocitos T CD4 no altera la protección conferida por la vacuna wP.

Con el fin de analizar la respuesta celular *in vitro* de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados de manera activa con la vacuna wP y depletados o no de linfocitos T CD4, realizamos un cultivo de los mismos para ser estimulados con un lisado de bacterias *B. pertussis* muertas por calor

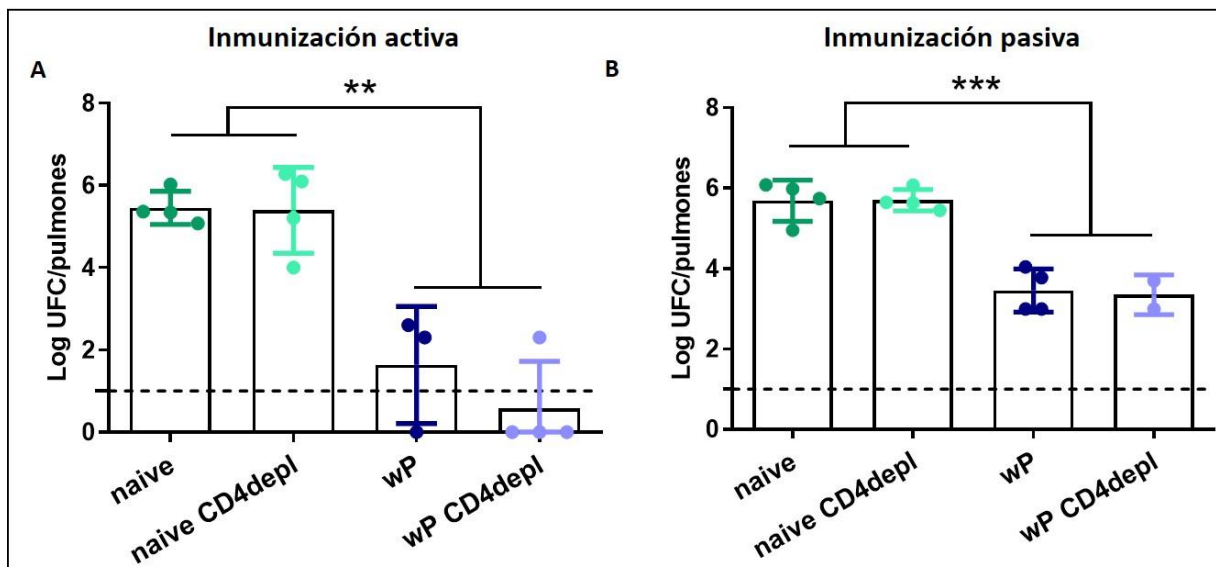


Figura 3A y B. Impacto de la depleción sistémica de linfocitos T CD4 en la protección contra *B. pertussis* en animales inmunizados activa (A) y pasivamente (B) con la vacuna comercial wP. Recuento de UFC de *B. pertussis* TOH en pulmones de ratones inmunizados activa y pasivamente con la vacuna comercial wP, depletados o no de linfocitos T CD4 y desafiados i.n. con una dosis subletal de *B. pertussis* TOH. Grupos de 4 animales por tratamiento; se grafica la media con su desviación estándar (SD); la línea punteada indica el límite de detección del método. Gráfico representativo de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a su respectivo control naive (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$).

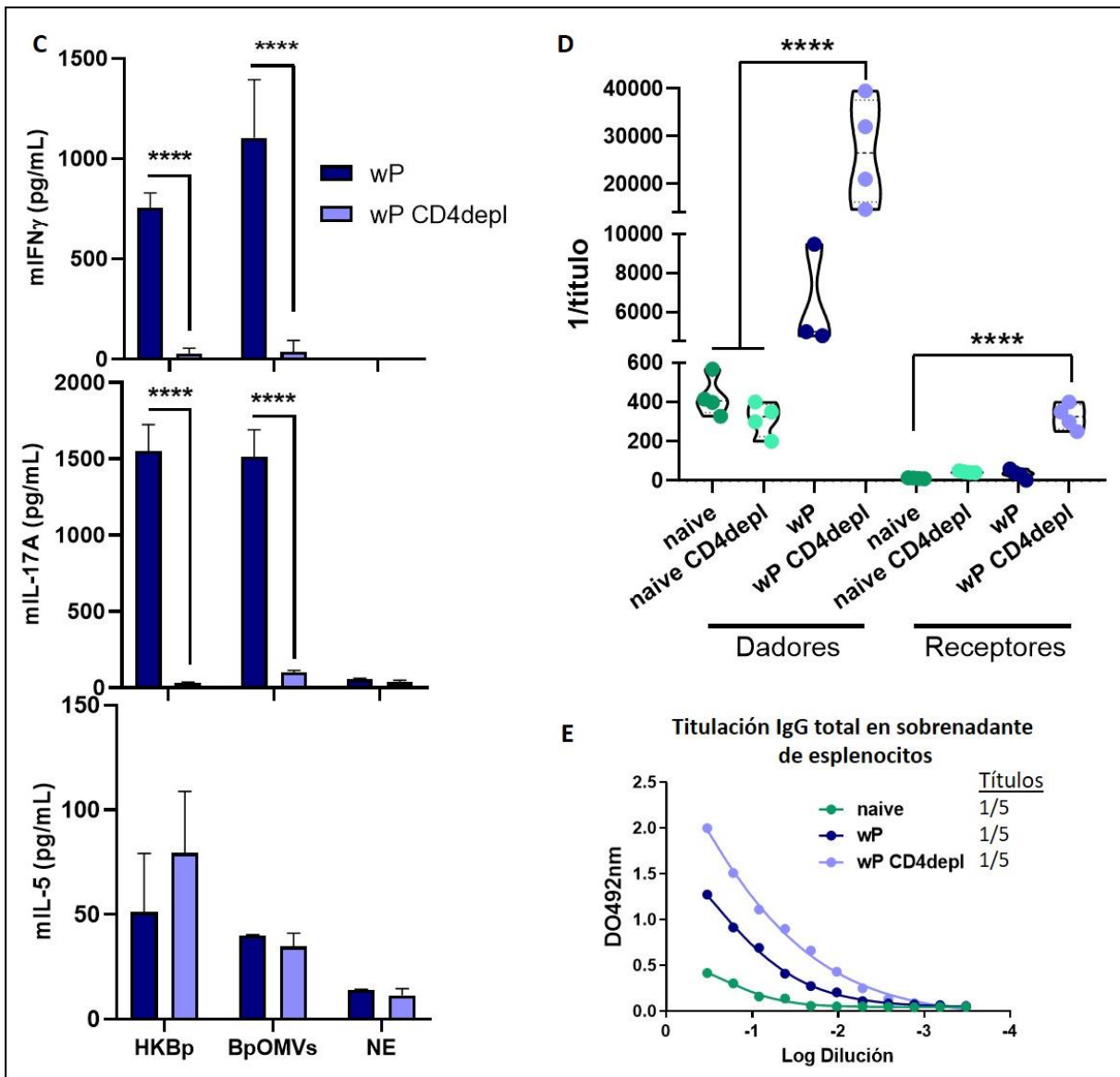


Figura 3C-E. Caracterización funcional del impacto de la depleción sistémica de linfocitos TCD4. Respuesta celular de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con wP, cultivados y estimulados con HKBp, BpOMVs o no estimulados (NE): medida de mIFN γ , mIL-17A y mIL-5 en sobrenadante de cultivo luego de una incubación de 72hs (C). Titulación de anticuerpos IgG total anti-HKBp en pools de sueros de ratones dadores y receptores de esplenocitos wP (D). Titulación de anticuerpos IgG total anti-HKBp en sobrenadante de esplenocitos a transferir (E). El cultivo de esplenocitos se realizó por triplicado por ratón; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a su respectivo control no depletado o naive (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$).

(HKBp) o BpOMVs durante 72 hs. Finalizado el periodo de incubación se colectaron los sobrenadantes y se midieron las citoquinas mIFN γ , mIL-17A y mIL-5 por ELISA. Los resultados alcanzados presentados en la Figura 3C, muestran que la secreción tanto de mIFN γ como mIL-17A disminuye significativamente

para los cultivos provenientes de bazo de ratones depletados con ascitis anti-CD4 respecto a los no depletados. Como era de esperarse no se observan diferencias en la secreción del marcador de un perfil de respuesta del tipo Th2, mL-5, ya que la vacuna comercial wP no lo induce mayormente. En la Figura 3D se muestra la titulación de los anticuerpos IgG totales anti-HKBp en los sueros de los ratones tanto dadores como receptores de bazo. En el caso de los individuos dadores, el título de los sueros provenientes de ratones inmunizados con la vacuna wP y depletados de linfocitos T CD4 fue significativamente mayor ($p < 0,0001$) que los provenientes de ratones naive y naive depletados de linfocitos T CD4. Para el caso del grupo inmunizado con wP, presentan un título mayor no significativamente diferente a los detectados en los grupos naive.

Los animales que recibieron los esplenocitos de ratones inmunizados con la vacuna wP y depletados de células T CD4 presentaron el mayor título de anticuerpos ($p < 0,0001$) entre los grupos inmunizados de manera pasiva. Con el objetivo de evaluar que los anticuerpos IgG detectados no provenían de la suspensión de esplenocitos a transferir, los determinamos por ELISA indirecto anti-HKBp en el sobrenadante de la suspensión celular. En dicha valoración no detectamos cantidades apreciables de los mismos entre los distintos grupos experimentales (Figura 3E). Todos estos resultados nos muestran que la disminución significativa de linfocitos T CD4 a nivel sistémico afecta la funcionalidad *in vitro* de los esplenocitos en cuanto a la secreción de citoquinas $\text{mIFN}\gamma$ y mL-17, pero no es suficiente para generar un impacto en la protección pulmonar. La protección observada en los grupos experimentales que fueron depletados de linfocitos T CD4 podría explicarse, en parte, por el aumento del título de anticuerpos en dichos grupos. Este aumento podría deberse a que, al ser depletados también los linfocitos T CD4 reguladores, esto afectaría la expansión y secreción de anticuerpos por los linfocitos B como un mecanismo compensatorio de la respuesta inmune (ver Discusión más adelante).

Teniendo presente que en la inmunización activa con depleción de linfocitos T CD4 pueden ser múltiples los actores inmunes formateados por la vacunación que colaboran en la resolución de la infección, es que nos planteamos profundizar en los mecanismos subyacentes en el escenario de inmunización pasiva donde el único actor efector presente son los esplenocitos transferidos. Para ello realizamos suspensiones de esplenocitos provenientes de animales inmunizados con nuestro candidato vacunal o con la vacuna wP comercial de forma de transferir a razón de $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{10}$ del bazo:1 ratón receptor naive. Como en los ensayos anteriores, a las 24 hs post transferencia de células, desafiamos intranasalmente con una dosis subletal de bacterias *B. pertussis* TOH, y una semana post desafío

sacrificamos los animales para realizar el recuento de UFC en los pulmones. Observamos que los ratones que recibieron un número de esplenocitos equivalentes a $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ de bazo inmune se encontraron significativamente protegidos en comparación al grupo naive ($p < 0,01$), pero no así los que recibieron una cantidad de células equivalente a $\frac{1}{10}$ de bazo (Figura 4A y B).

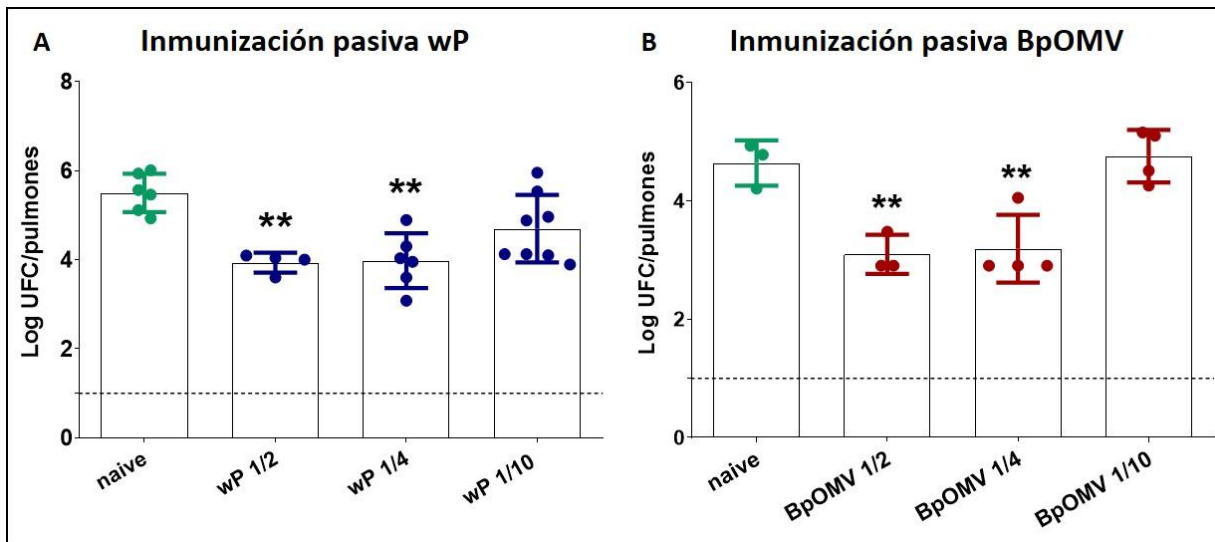


Figura 4A y B. Medida de la protección conferida por distintas cantidades de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con la vacuna comercial wP (A) o nuestro candidato vacunal BpOMV (B). Recuento de UFC de *B. pertussis* TOH en pulmones de ratones inmunizados pasivamente con diluciones de suspensiones de esplenocitos equivalentes a $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{10}$ del bazo entero/receptor naive, provenientes de ratones inmunizados con wP (A) y BpOMV (B) y desafiados i.n. con una dosis subletal de *B. pertussis* TOH. Grupos de al menos 4 animales por tratamiento; se grafica la media con su desviación estándar (SD); la línea punteada indica el límite de detección del método. Gráfico representativo de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a su respectivo control naive ($*p \leq 0.05$ y $**p \leq 0.01$).

Al momento del sacrificio dosamos anticuerpos IgG totales anti-HKBP en los sueros provenientes tanto de los ratones dadores de bazo como en los de los receptores. Luego de la inmunización activa y de acuerdo a lo esperado, los títulos detectados en los grupos dadores de esplenocitos fueron significativamente mayores que los títulos de los grupos receptores de esplenocitos (inmunizados pasivamente) (Figura 4C). Los títulos de anticuerpos de los grupos dadores inmunizados con wP y BpOMV fueron significativamente mayores en comparación al grupo naive ($p < 0,01$). En aquellos grupos que recibieron cantidades de esplenocitos equivalentes a $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ de bazo provenientes de animales inmunizados con wP se detectaron títulos mayores, aunque no significativamente diferentes, respecto del grupo receptor de esplenocitos naive. Los títulos de anticuerpos IgG de los grupos que recibieron una cantidad de células equivalente a $\frac{1}{10}$ de bazo

provenientes de animales inmunizados con wP y todos los grupos que recibieron esplenocitos BpOMV, fueron similares al grupo control naíve (Figura 4C). Estos resultados apoyarían la idea de que existen mecanismos de protección redundantes mediados por células efectoras y que es posible obtener un “umbral mínimo” de protección a través de ellos, por debajo del cual comienza a evidenciarse una pérdida de protección. En acuerdo con esta hipótesis, los títulos de anticuerpos en los sueros de los animales receptores que recibieron una cantidad de esplenocitos equivalente a 1/10 del bazo wP, resultaron ser algo menores que los de los grupos que recibieron la cantidad de esplenocitos equivalente a ½ y ¼ de bazo wP, indicando un posible rol a los anticuerpos generados por los linfocitos B transferidos.

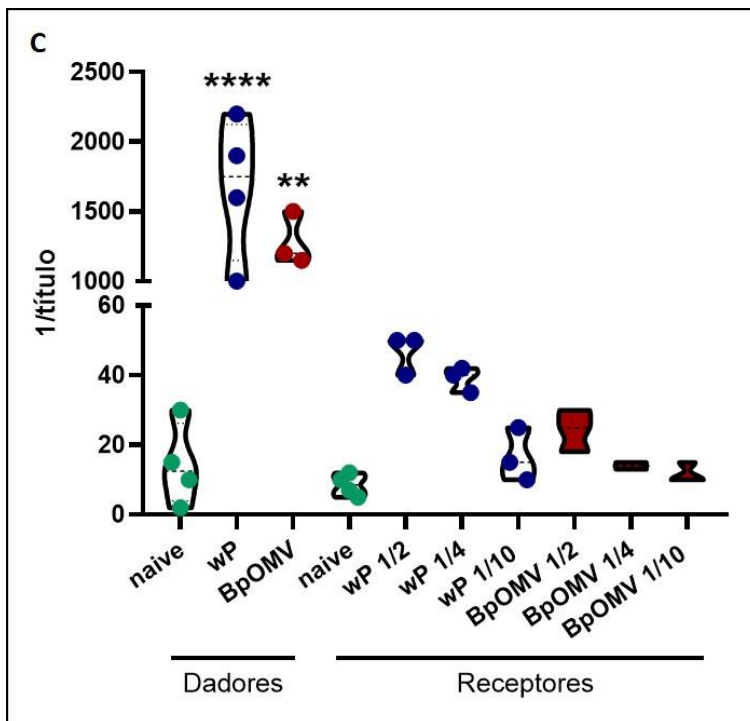


Figura 4C. Titulación de anticuerpos IgG totales anti-HKBP por la técnica de ELISA en pools de sueros de ratones dadores y receptores de esplenocitos. Se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráfico representativo de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a su respectivo control naíve (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$).

Teniendo en cuenta estos resultados, diseñamos un nuevo ensayo de inmunización pasiva por transferencia de una cantidad de esplenocitos equivalente a $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{50}$ de bazo proveniente de ratones inmunizados con wP o BpOMV, agregando la condición de depleción de linfocitos T CD4 previamente a la transferencia. En estos ensayos, detectamos que los únicos grupos significativamente protegidos en comparación con el grupo naive, fueron aquellos que recibieron una cantidad de esplenocitos equivalente a $\frac{1}{4}$ de bazo wP o BpOMV. Los grupos que recibieron esplenocitos de animales depletados de células T CD4 y los que recibieron la cantidad de esplenocitos equivalente a $\frac{1}{50}$ de bazo de cualquiera de las condiciones, presentaron un recuento de UFC de *B. pertussis* similar a los grupos naive (Figura 5A y B). En estos experimentos procedimos también a la evaluación de la respuesta celular *in vitro* en el contexto de inmunización con nuestro candidato vacunal incluyendo la depleción anti-CD4. Nuevamente detectamos que la secreción de citoquinas mIFN γ , mL-17A e incluso la de mL-5 luego de la incubación con los estímulos HKBp y BpOMVs, fue significativamente menor para los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados y CD4 depletados en comparación con los provenientes de los grupos inmunizados sin depletar (Figura 5C). Los títulos de anticuerpos IgG totales anti-HKBp en los

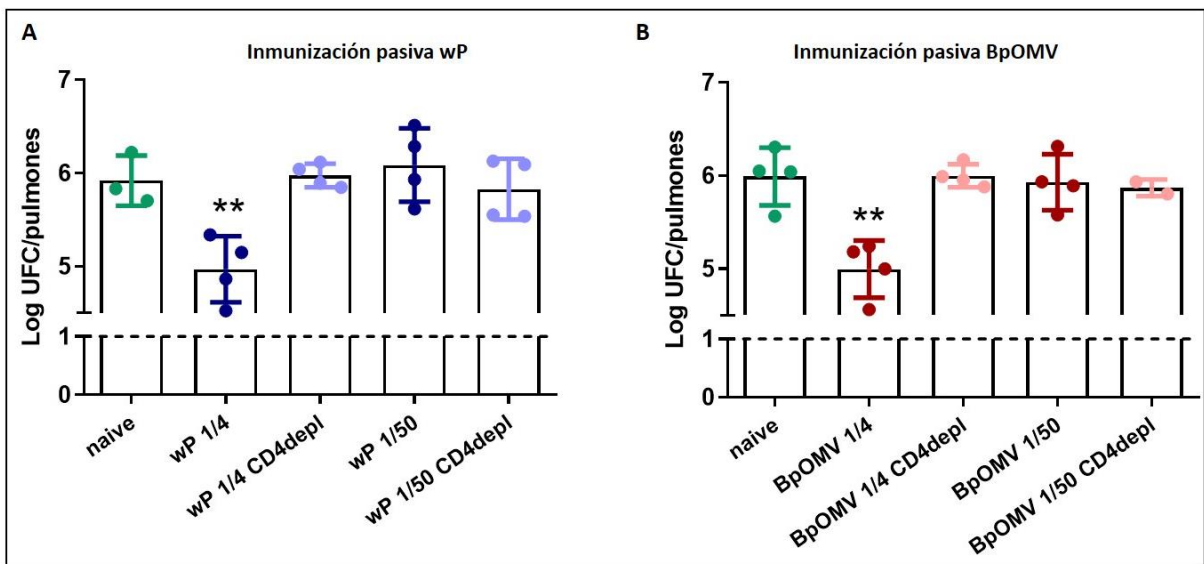


Figura 5A y B. Impacto de la depleción sistémica de linfocitos T CD4 en la protección contra *B. pertussis* en animales inmunizados pasivamente con esplenocitos provenientes de animales vacunados con la vacuna comercial wP (A) y con nuestro candidato vacunal BpOMV (B). Recuento de UFC de *B. pertussis* TOH en pulmones de ratones inmunizados pasivamente con cantidades de esplenocitos equivalentes a $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{50}$ del bazo entero provenientes de ratones inmunizados con wP (A) y BpOMV (B), depletados o no de linfocitos T CD4. 24 hs post transferencia fueron desafiados *i.n.* con una dosis subletal de *B. pertussis* TOH. Grupos de 4 animales por tratamiento; se grafica la media con su desviación estándar (SD); la línea punteada indica el límite de detección del método. Gráfico representativo de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a su respectivo control naive (* $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.01$).

sueros de ratones dadores de bazo inmunizados fueron significativamente mayores en comparación al grupo naive ($p < 0,001$). No se observan diferencias significativas entre los grupos inmunizados e inmunizados y depletados de linfocitos T CD4. Entre los grupos experimentales receptores de esplenocitos, no se observan diferencias significativas en los títulos IgG anti-HKBp, pero sí todos son

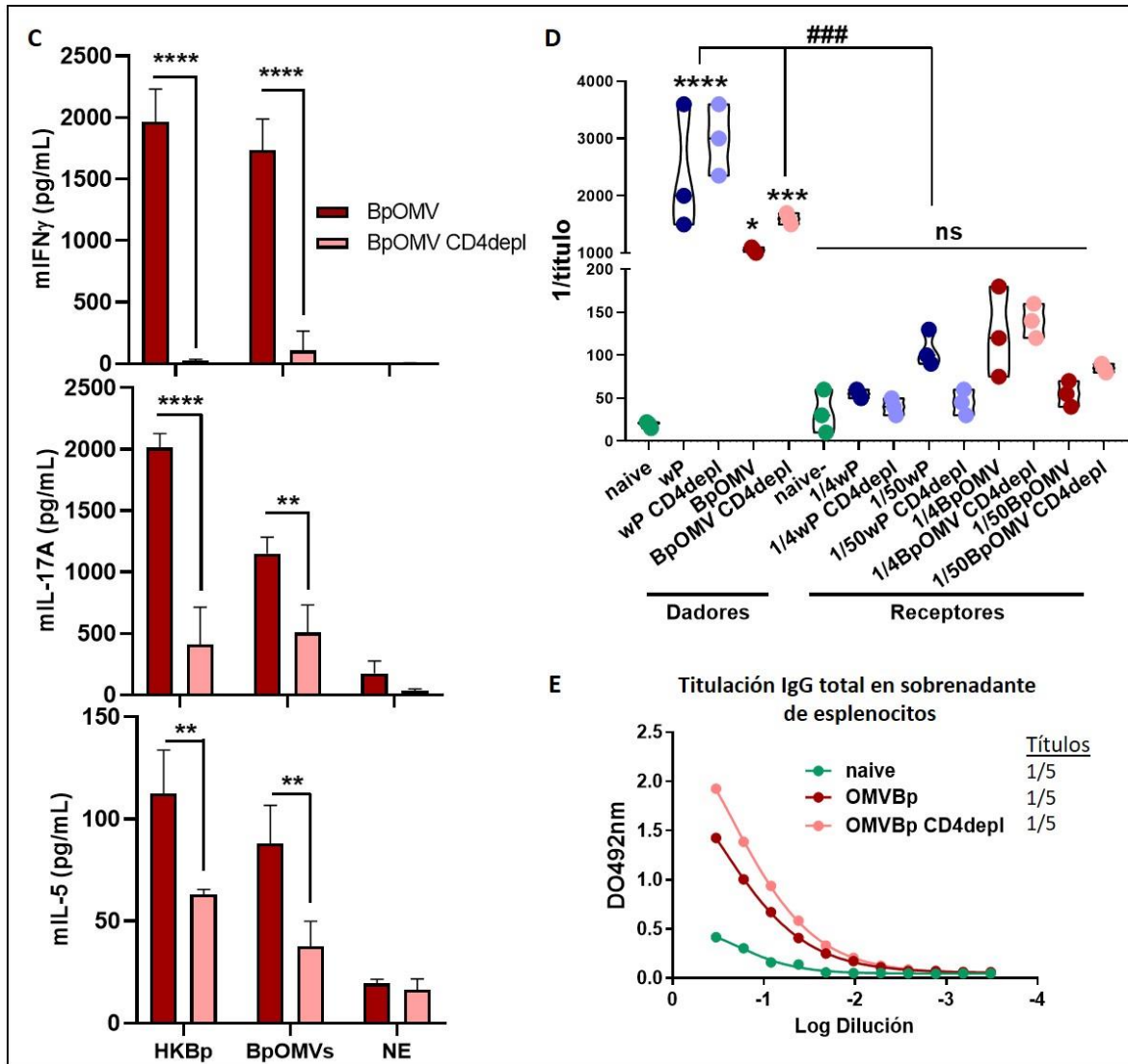
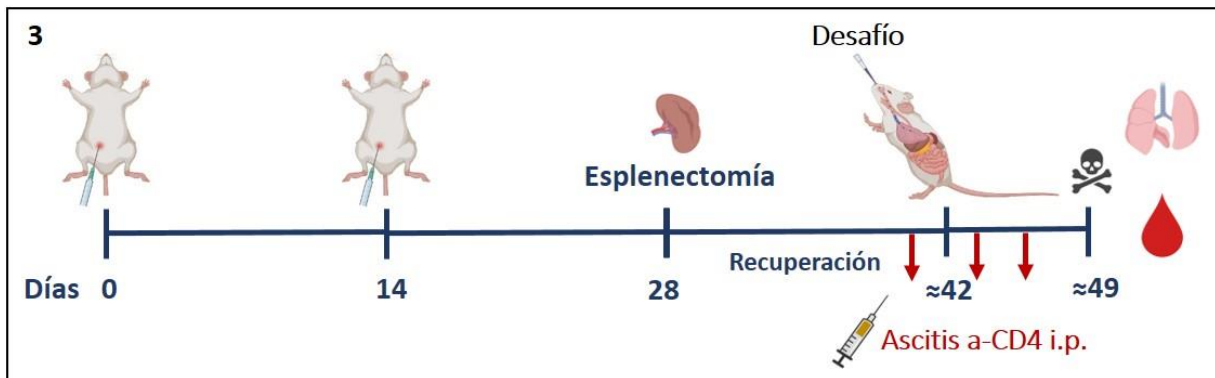


Figura 5C-E. Caracterización funcional del impacto de la depleción sistémica de linfocitos T CD4. Respuesta celular de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con BpOMV, cultivados y estimulados con HKBP, BpOMVs o no estimulados (NE): medida de mIFN γ , mIL-17A y mIL-5 en sobrenadante de cultivo luego de una incubación de 72hs (C). Titulación de anticuerpos IgG total anti-HKBp en pools de sueros de ratones dadores y receptores de esplenocitos wP y BpOMV (D). Titulación de anticuerpos IgG total anti-HKBp en sobrenadante de esplenocitos a transferir (E). El cultivo de esplenocitos se realizó por triplicado por ratón; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a su respectivo control no depletado o naive ($*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$ y $****p \leq 0,0001$). # indica un resultado diferente entre inmunización pasiva y activa ($\#p \leq 0,05$, $\#\#p \leq 0,01$ y $\#\#\#p \leq 0,001$).

significativamente menores que los títulos detectados en los grupos inmunizados de manera activa (Figura 5D). Nuevamente, como en los casos anteriores, confirmamos por el método de ELISA indirecto anti-HKBP que los anticuerpos IgG detectados no provenían de la suspensión de esplenocitos a transferir (Figura 5E).



Esquema 3. Esquema de inmunización activa, remoción de bazo por cirugía y desafío i.n. en ratones BALB/c. Al momento del sacrificio se disecan pulmones para recuento de UFC y se toma muestra de sangre para titular anticuerpos en suero y para análisis de poblaciones por citometría de flujo.

En suma, todos estos resultados muestran que el impacto cuanti y cualitativo de la depleción sistémica de linfocitos T CD4 es posible evidenciarlo sólo en un escenario de inmunización pasiva por transferencia de una cantidad de esplenocitos equivalente a $\frac{1}{4}$ de bazo proveniente de animales inmunizados con la vacuna comercial wP o con nuestro candidato vacunal y depletados, a 1 animal receptor naíve.

Una posible explicación de la redundancia observada en la protección celular contra el desafío con *B. pertussis* en nuestro modelo, puede ser que los porcentajes celulares remanentes luego de la depleción sistémica de linfocitos T CD4 (0,557% y 0,132% de linfocitos CD3+CD4+ en bazo y sangre periférica respectivamente, Figura 2A y B), sufran una expansión clonal luego de la re-estimulación generada por el desafío, y así alcanzar la zona de infección y permitir la eliminación bacteriana. Por esto nos preguntamos si la remoción del bazo en animales inmunizados podría afectar la protección anti *B. pertussis* debido principalmente a una disminución drástica de las poblaciones efectoras periféricas.

Para corroborar entonces la implicancia de una mayor disminución de células efectoras sistémicas en la protección anti-pertussis se esplenectomizaron ratones inmunizados con nuestro candidato vacunal BpOMV y con la vacuna comercial wP. En estos experimentos incluimos también a

grupos de ratones inmunizados (wP, BpOMV y aP), esplenectomizados y depletados sistémicamente de linfocitos T CD4 o sin depleción, mostraron un recuento de UFC de *B. pertussis* significativamente menor respecto a los grupos control naive y SHAM ($p < 0,001$). Los recuentos que se presentan en la Figura 6A corresponden a la compilación de 3 experimentos independientes. Los resultados alcanzados muestran que todos los grupos experimentales inmunizados, independientemente de la remoción del bazo y la depleción sistémica de linfocitos T CD4, se encuentran protegidos frente al desafío intranasal con *B. pertussis* TOH. Los títulos de anticuerpos en sueros provenientes de los ratones inmunizados con wP y BpOMV previamente a ser esplenectomizados muestran un nivel significativamente mayor en comparación con el grupo naive ($p < 0,05$). El grupo de animales inmunizados con aP presenta un título anti-HKBp que no difiere del grupo naive. Luego de las esplenectomías se observa que los grupos inmunizados con wP y BpOMV y depletados de linfocitos T CD4 presentan títulos de anticuerpos significativamente mayores respecto al grupo naive y a sus contrapartes no depletadas ($p < 0,001$). Nuevamente se observa el mismo comportamiento para el grupo aP depletado respecto de su contraparte sin depletar, pero la diferencia no llega a ser significativa.

Por último, luego del desafío intranasal, todos los grupos aquí incluidos, presentaron niveles mayores de título de anticuerpos en comparación con el grupo naive, siendo el lote inmunizado con BpOMV el único que presentó una diferencia significativa ($p < 0,05$, Figura 6B). El análisis por citometría de flujo de sangre periférica realizado antes y después de la intervención quirúrgica permitió evidenciar que el porcentaje de células linfoides circulantes en los grupos esplenectomizados fue menor respecto al detectado antes de la intervención. Más aún, el porcentaje de linfocitos sanguíneos circulantes post-desafío fue significativamente menor en todos los grupos experimentales comparado con el escenario pre-esplenectomía ($p < 0,05$), a excepción del grupo inmunizado con la vacuna comercial aP. Para este último grupo no se observaron diferencias significativas en porcentaje de linfocitos circulantes entre los distintos momentos analizados. Este escenario de disminución relativa de linfocitos sanguíneos circulantes en los grupos naive, wP y BpOMV, puede explicarse por la relocalización de células inmunes al sitio de infección luego del desafío i.n. (Figura 6C). En cuanto a los grupos CD4 depletados, no se observan diferencias en circulación de células linfoides antes y después del desafío, a excepción del grupo aP en donde la circulación de esta población celular disminuye significativamente post-desafío ($p < 0,001$).

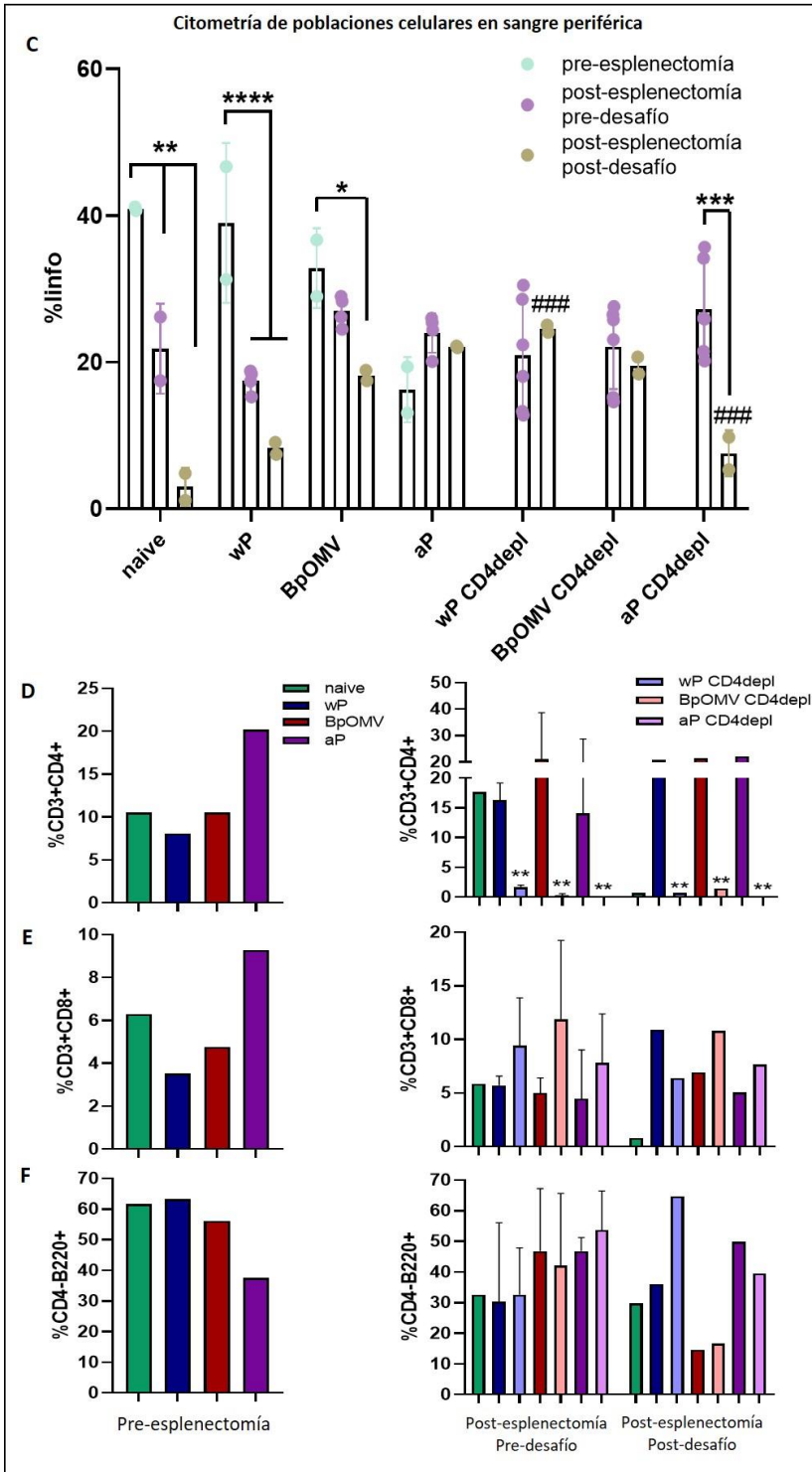
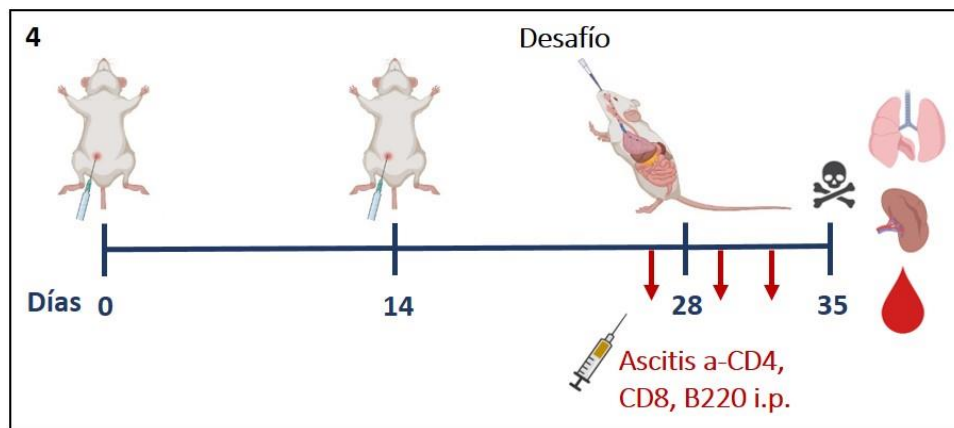


Figura 6C-F. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones linfoides circulantes en sangre periférica de ratones inmunizados, esplenectomizados y/o desafiados i.n. con *B. pertussis*. Porcentaje de células linfoides pre-, post-esplenectomía y post-desafío (C). Porcentaje de poblaciones circulantes CD3+CD4+ (D), CD3+CD8+ (E) y CD4-B220+ (F), pre-, post-esplenectomía y post-desafío. Pooles de sangre de al menos 4 animales por tratamiento; se grafica la media con su desviación estándar (SD); gráficos de 3 experimentos independientes juntos. * indica un resultado significativamente diferente a la condición pre-esplenectomía o según indique la barra (C) o en comparación a su contraparte no depletada (D, panel derecho) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$). # indica un resultado diferente a la condición post-esplenectomía pre-desafío (# $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$ y ### $p \leq 0.001$).**

En el escenario post-desafío, sólo los grupos wP y aP CD4 depletados presentaron diferencias significativas (mayor y menor respectivamente) en cuanto a circulación de linfocitos en sangre en comparación con sus contrapartes no depletadas ($p < 0,001$, Figura 6C). Por otro lado, la circulación de las poblaciones linfocitarias CD3+CD4+ (Figura 6D), CD3+CD8+ (Figura 6E) y CD4-B220+ (Figura 6F) no se vieron afectadas antes y después de la cirugía, o antes y después del desafío i.n. entre los grupos experimentales. Sólo se observa una disminución significativa de la población CD3+CD4+ circulante en aquellos grupos que fueron inoculados con ascitis anti-CD4 ($p < 0,01$, Figura 6D, panel derecho).



Esquema 4. Esquema de inmunización activa y depleción sistémica de linfocitos CD4, CD8, B220 y desafío i.n. en ratones BALB/c. Al momento del sacrificio se disecan pulmones para recuento de UFC, bazo para análisis por citometría de flujo, y se toma muestra de sangre para titulación de anticuerpos en suero y análisis por citometría de flujo.

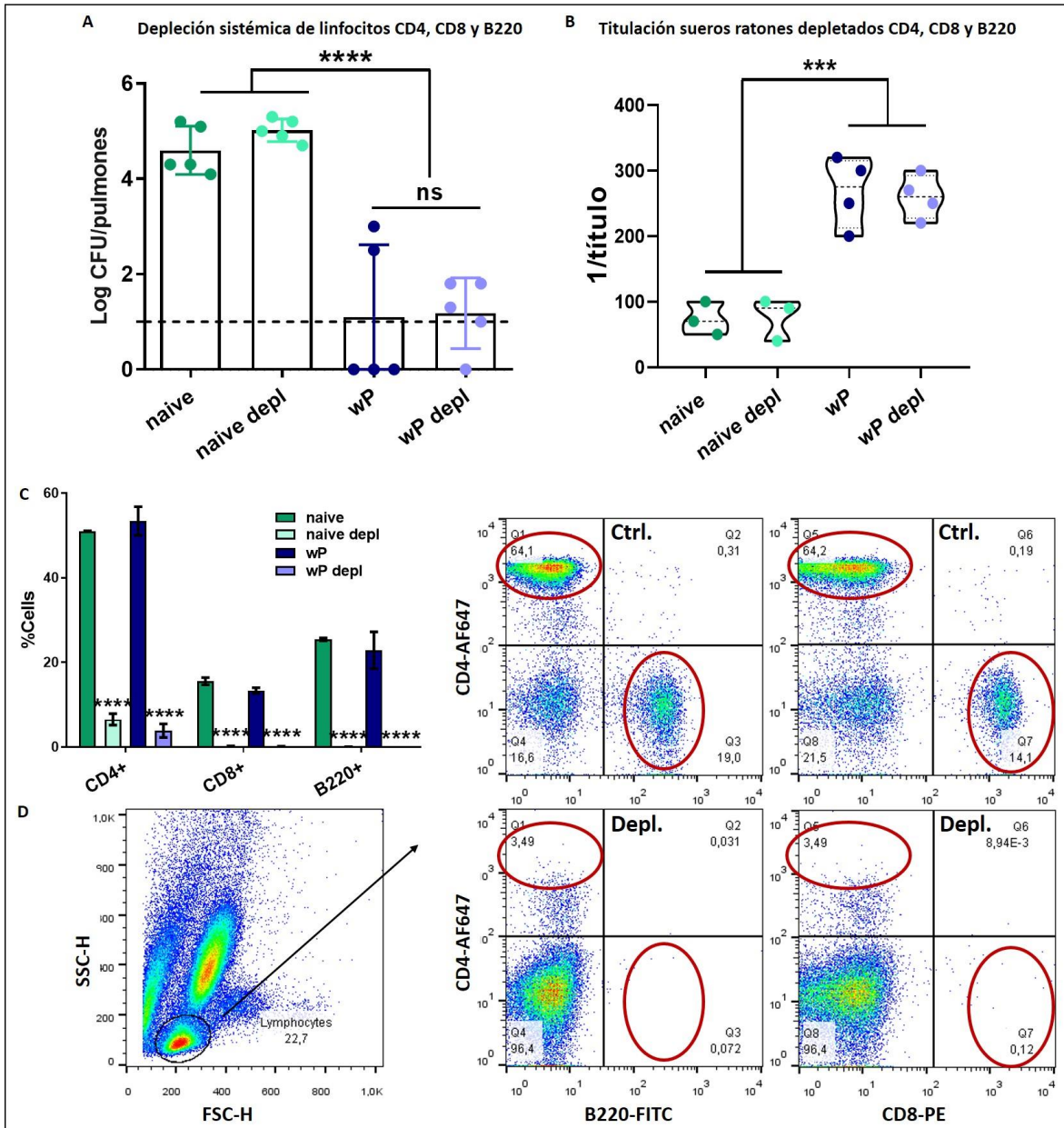


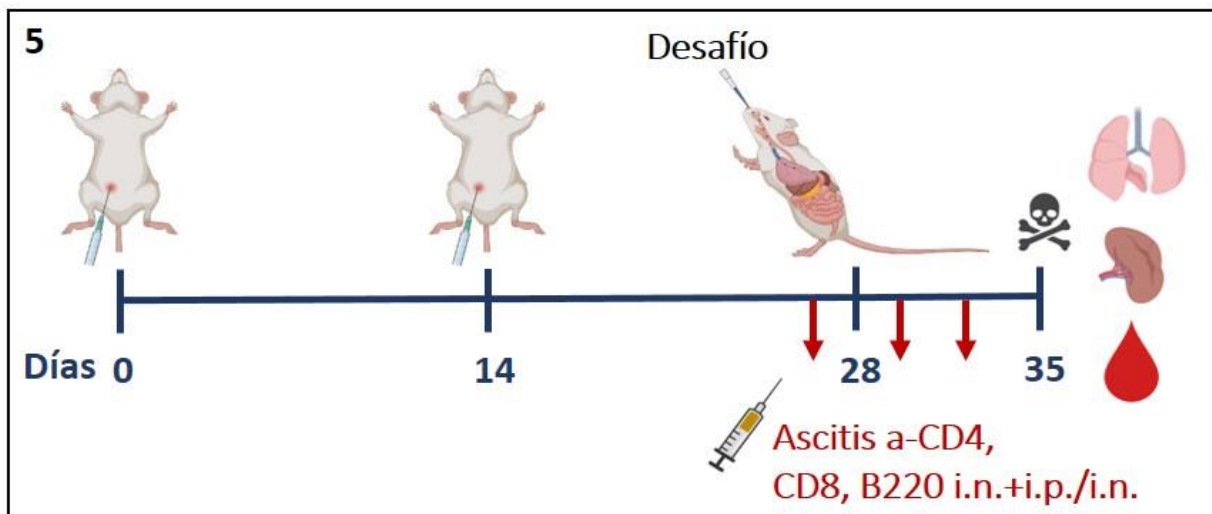
Figura 7. Impacto de la depleción sistémica de linfocitos T CD4, T CD8 y B220 en la protección contra B. pertussis. Recuento de UFC de B. pertussis TOH en pulmones de ratones inmunizados activamente con la vacuna comercial wP, depletados o no de linfocitos T CD4, T CD8 y B220, y desafiados i.n. con una dosis subletal de B. pertussis TOH (A). Titulación de anticuerpos IgG total anti-HKBP en pools de sueros de ratones depletados de linfocitos T CD4, T CD8 y B220 (B). Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares circulantes en sangre periférica previo al desafío i.n.: porcentaje de linfocitos T CD4, T CD8 y B220 de los distintos grupos experimentales de animales inmunizados con la vacuna comercial wP y depletados sistémicamente con ascitis anti-CD4, -CD8 y -B220 (C). Gráficos Dot Plot representativos del gráfico C (D). Grupos de al menos 4 animales por tratamiento; se grafica la media con su desviación estándar (SD); la línea punteada indica el límite de detección del método. Gráfico representativo de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a su respectivo control naive o naive depletado (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 y **** p<0.0001).

Teniendo en cuenta nuestros resultados y el posible rol de la población linfocitaria CD8 y B220 comentada en la Introducción de esta tesis ^{173,202-205}, decidimos realizar un experimento de depleción que abarque a más poblaciones celulares. Trabajamos para ello en el contexto de inmunización activa más robusto y conocido en cuanto a respuesta celular protectora, la vacuna comercial wP. Así, sobre animales inmunizados realizamos la depleción sistémica i.p. de las poblaciones linfocitarias CD4, CD8 y B220 con una mezcla de 200 µg de proteína total de cada ascitis conteniendo los anticuerpos monoclonales correspondientes. En este esquema de depleción (Esquema 4), las inoculaciones se realizaron 24 hs antes y 24 y 72 hs después del desafío intranasal. Nuevamente, el recuento de UFC en pulmones fue similar entre los grupos inmunizado y su contraparte inmunizado y depletado, y significativamente menor en comparación con los controles naive (Figura 7A). Los títulos de anticuerpos IgG anti-HKBp de los grupos inmunizados e inmunizados y depletados dieron significativamente mayores en comparación a los grupos naive y naive depletado ($p < 0,001$, Figura 7B). Por otro lado, el análisis de poblaciones linfocitarias por citometría de flujo de sangre periférica previo al desafío, muestra una disminución significativa de las poblaciones circulantes CD4, CD8 y B220 en los grupos depletados en comparación con sus respectivas contrapartes no depletadas ($p < 0,0001$, Figura 7C). En la Figura 7D se muestra un gráfico Dot Plot representativo del control de depleción de poblaciones linfocitarias por citometría de flujo.

Con estos resultados podemos concluir que la respuesta inmune montada por la inmunización con las distintas vacunas estudiadas es redundante en el modelo murino de pertussis. Estos resultados pusieron de manifiesto que al menos en nuestro modelo, no nos fue posible corroborar el rol protector de distintas poblaciones linfocitarias con la estrategia de depleción sistémica de células específicas, en particular el rol de linfocitos T CD4, frente a la infección por *B. pertussis*. Sin embargo, con la evidencia surgida durante la realización de estos ensayos, era posible hipotetizar que poblaciones locales (pulmonares) quedarán inaccesibles a la depleción por vía sistémica y por ello decidimos avanzar en la caracterización a nivel pulmonar de las poblaciones CD4/CD8/B220.

1.3. Caracterización del rol funcional local (pulmonar) de las poblaciones CD4/CD8/B220 en el contexto del modelo murino de protección.

Para evidenciar el rol de los linfocitos T CD4, T CD8 y B220 pulmonares en la protección contra pertussis en el modelo murino de infección por *B. pertussis*, realizamos depleciones locales de dichas poblaciones linfocitarias. En el Esquema 5 se muestra la estrategia de depleción, la cual consistió en la inoculación de 200 µg. de proteína total de una mezcla de ascitis depletante anti-CD4/CD8/B220 por vía i.n. (local) y en combinación de vías i.n. e i.p. (local y sistémica) a ratones inmunizados con las vacunas wP o BpOMV, 24 hs antes y 24 y 72 hs después del desafío i.n. con *B. pertussis* TOH. En este escenario, los recuentos de UFC de pulmones provenientes de los grupos naive, wP y BpOMV depletados no mostraron diferencias entre ellos, mientras que sólo los grupos inmunizados con wP o BpOMV presentaron protección pulmonar frente al desafío con *B. pertussis* en comparación al grupo naive (Figura 8A). Se realizaron controles de depleción sistémica en sangre periférica y estos no evidenciaron la circulación de CD3+CD8+, CD3+CD4+ y CD4-B220+ en los grupos depletados por ambas vías (i.p. e i.n.). Para el caso de los grupos depletados de manera local (i.n.), la circulación sanguínea de linfocitos fue comparable a la de los grupos no depletados, excepto para el caso de linfocitos



Esquema 5. Esquema de inmunización activa, depleción sistémica y/o local (pulmonar) de linfocitos CD4, CD8, B220 y desafío i.n. en ratones BALB/c. Al momento del sacrificio se disecan pulmones para recuento de UFC y análisis de poblaciones por citometría de flujo, bazo para análisis por citometría de flujo, y se toma muestra de sangre para titulación de anticuerpos en suero y análisis por citometría de flujo.

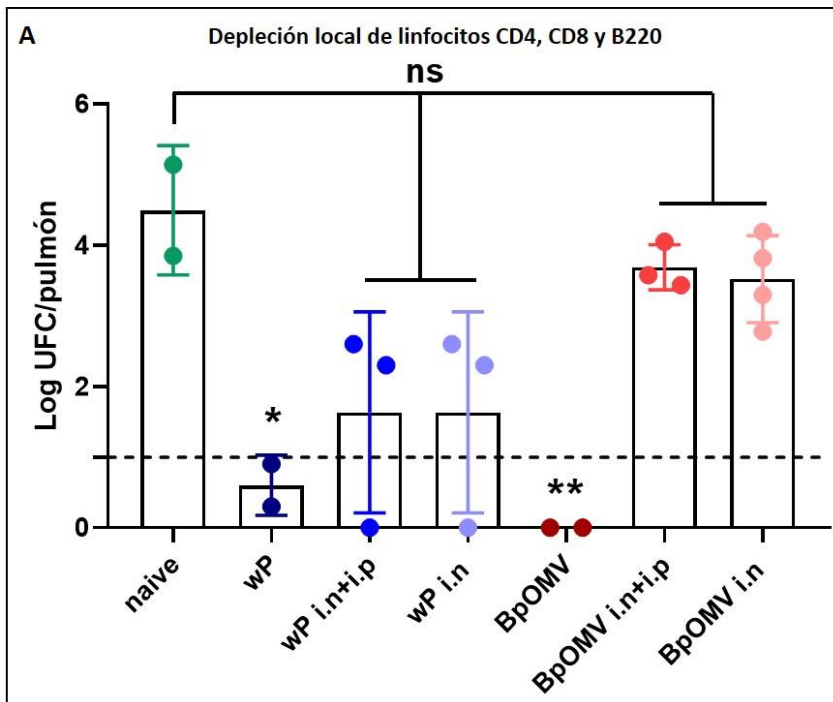


Figura 8A. Impacto de la depleción local de linfocitos T CD4, T CD8 y B220 en la protección contra *B. pertussis*. Recuento de UFC de *B. pertussis* TOH en pulmones de ratones inmunizados activamente con la vacuna comercial wP o con BpOMV, depletados local y/o sistémicamente de linfocitos T CD4, T CD8 y B220 y desafiados i.n. con *B. pertussis* TOH. Grupos de al menos 2 animales por tratamiento; se grafica la media con su desviación estándar (SD); la línea punteada indica el límite de detección del método. * indica un resultado significativamente diferente en comparación al grupo naive (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$).

CD3+CD4+, donde los grupos BpOMV y wP depletados mostraron una circulación significativamente menor en comparación a los grupos no depletados, pero mayor a los grupos depletados por ambas vías ($p < 0,01$, Figura 8B). En la Figura 8C se muestra un gráfico Dot Plot representativo del ensayo de control de depleción sistémica en sangre periférica post 2da inoculación de la ascitis depletante. Como puede observarse en la Figura 8D y E, los análisis por citometría de células de bazo y pulmón al momento del sacrificio muestran escenarios distintos. En el estudio de células de bazo, similar a los análisis en sangre periférica, se observa que en los grupos depletados de manera sistémica y local, las poblaciones estudiadas disminuyen significativamente en comparación con los grupos no depletados ($p < 0,05$, Figura 8D), mientras los grupos depletados por vía local, no presentan diferencias significativas en cuanto porcentajes de células en comparación con los grupos no depletados (Figura 8D). En el estudio de las poblaciones linfocitarias pulmonares, todos los grupos depletados (vía i.p. + i.n. e i.n.) presentaron una disminución significativa de las tres poblaciones analizadas (en comparación con los grupos no depletados ($p < 0,0001$, Figura 8E). En las Figuras 8F y G se muestran gráficos Dot Plot representativos de las citometrías de bazo y pulmón respectivamente. Se titularon anticuerpos IgG anti-HKBp en suero y no se observan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales,

aunque sí una tendencia en cuanto a mayor título en todos los grupos experimentales inmunizados, independientemente de si fueron depletados o no de linfocitos (Figura 8H).

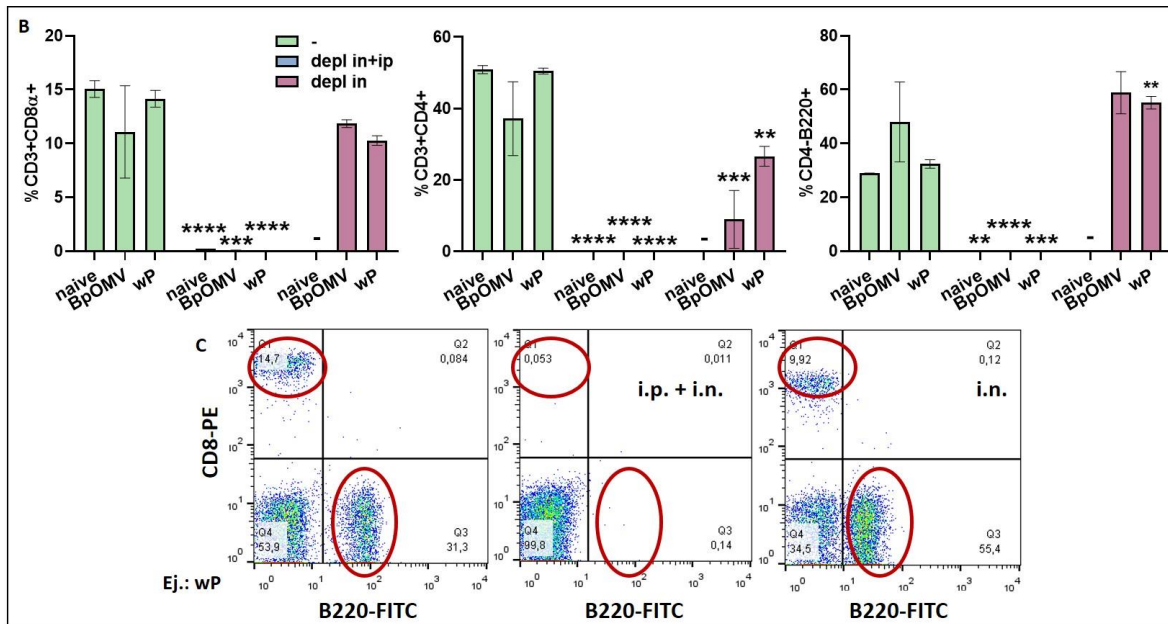


Figura 8B y C. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares circulantes en sangre periférica previo al desafío. Porcentaje de células CD8+, CD4+ y B220+ de los distintos grupos experimentales de animales inmunizados con la vacuna comercial wp y nuestro candidato vacunal BpOMV y depletados sistémica y/o localmente con ascitis anti-CD4, -CD8 y -B220 (B). Gráficos Dot Plot representativos del gráfico B (C). Grupos de al menos 2 animales por tratamiento; se grafica la media con su desviación estándar (SD). * indica un resultado significativamente diferente en comparación a su respectivo control (contraparte sin depletar) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$).

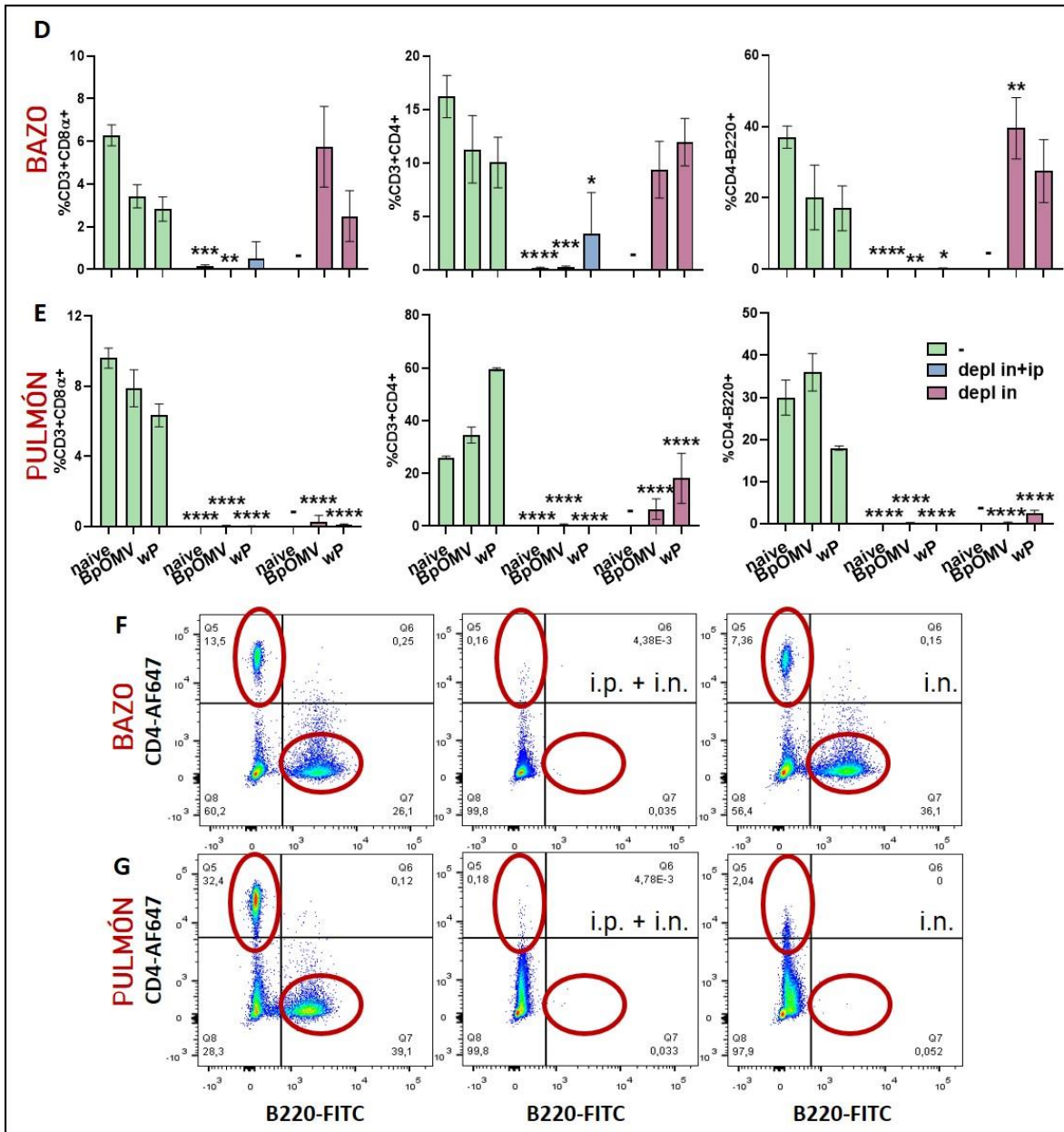


Figura 8D-G. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares de bazo y pulmón de ratones inmunizados con las vacunas wP o BpOMV y depletados de manera local y/o sistémica de linfocitos T CD4, T CD8 y B220, post-desafío con B. pertussis. Porcentaje de células CD8+, CD4+ y B220+ de los distintos grupos experimentales de animales inmunizados con la vacuna comercial wP y nuestro candidato vacunal BpOMV y depletados de manera local y/o sistémica con ascitis anti-CD4, -CD8 y -B220 de bazo (D) y pulmón (E). Gráficos Dot Plot representativos de los gráficos D y E (F y G respectivamente). Grupos de al menos 2 animales por tratamiento; se grafica la media con su desviación estándar (SD). * indica un resultado significativamente diferente en comparación a su respectivo control (contraparte sin depletar) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 y **** p<0.0001).

Con estos resultados podemos concluir que efectivamente, en el modelo murino de inmunización e infección por *B. pertussis*, las poblaciones de linfocitos T de memoria residentes de tejido pulmonar, contribuyen de manera significativa en los mecanismos montados por la vacunación para la protección.

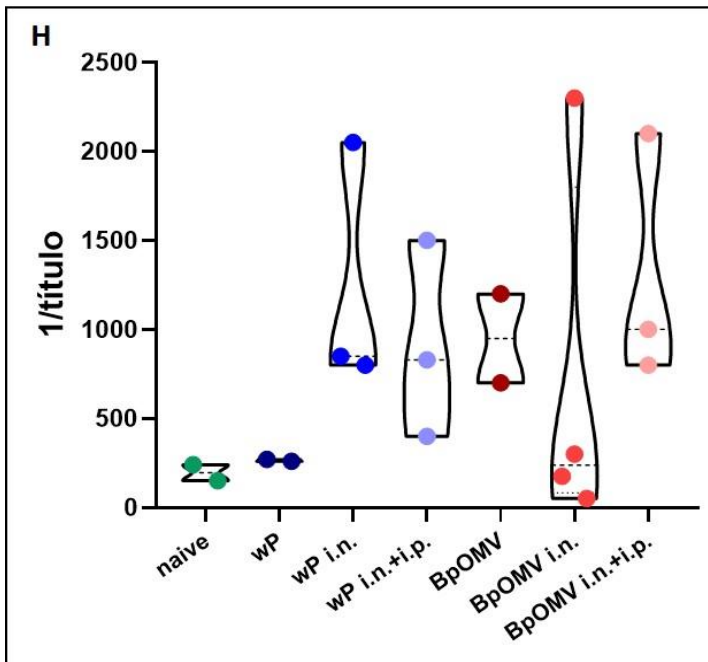


Figura 8H. Título de anticuerpos IgG totales anti-HKBp en sueros de ratones inmunizados con WP o BpOMV y depletados de linfocitos T CD4, T CD8 y B220. Titulación de anticuerpos IgG total anti-HKBp por la técnica de ELISA en pools de sueros de ratones depletados de manera local y/o sistémica con ascitis anti- CD4, -CD8 y -B220 post desafío.

Discusión

En este Capítulo pudimos mostrar que producimos exitosamente líquido ascítico conteniendo anticuerpos monoclonales con capacidad depletante de poblaciones específicas T CD4, T CD8 y B220. Esta capacidad la evidenciamos a través de análisis por citometría de flujo tanto de sangre periférica como de bazo y pulmón de los ratones utilizados en los distintos esquemas experimentales presentados. Esta herramienta producida resultó ser robusta a lo largo de los ensayos llevados a cabo.

Las tres vacunas evaluadas en el Capítulo, las dos comerciales y nuestro candidato vacunal, generan respuestas celulares protectoras en el modelo murino. No obstante, la predominancia de un perfil Th sobre otros y los mecanismos protectores difieren entre ellas. Como ya se ha mencionado anteriormente, el mecanismo protector del perfil Th17 generado por la vacuna aP sería por la atracción y activación de neutrófilos generadas por IL-17, mientras que las vacunas wP y BpOMV además del Th17, inducen un perfil Th1 que activa macrófagos a través de la secreción de IFN γ . Los experimentos aquí presentados de depleción sistémica de linfocitos T CD4 en los modelos tanto de inmunización activa como pasiva con wP o BpOMV por transferencia de células, no mostraron diferencias en el nivel de protección analizado por recuentos de UFC de *B. pertussis* en los pulmones. De manera similar, en el modelo de inmunización activa con las tres vacunas evaluadas, remoción quirúrgica de bazo y depleción sistémica de linfocitos T CD4 tampoco se observó diferencia en comparación a los animales no intervenidos en cuanto a capacidad protectora contra la infección con *B. pertussis*. Tampoco la depleción sistémica de las tres poblaciones linfocitarias, CD4, CD8 y B220, en el escenario de inmunización activa con wP tuvo impacto alguno en el recuento de UFC. Es decir, más allá de los tipos de respuesta celulares distintivos generados por cualquiera de las 3 vacunas, las poblaciones linfocitarias sistémicas removidas por depleción se muestran dispensables para la protección contra *B. pertussis* en nuestros modelos. Es interesante resaltar que en el escenario de depleción de una o las tres poblaciones linfocitarias sólo pudimos observar una diferencia significativa en el nivel protección frente al desafío, en el modelo de inmunización pasiva por inoculación de una cantidad de esplenocitos equivalente a $\frac{1}{4}$ de bazo, provenientes de ratones inmunizados y depletados de linfocitos T CD4 y, cuando la depleción de las poblaciones T CD4, T CD8 y B220 fue realizada de manera intranasal en animales inmunizados de manera activa.

Todos estos resultados nos llevan a reflexionar sobre la diversidad de actores y/o mecanismos que se desencadenan tras la inmunización activa y cómo estos actúan incluso luego de realizar las

depleciones sistémicas de linfocitos manteniendo inalterados los niveles de protección. Anticuerpos, poblaciones celulares en otros órganos linfoides secundarios inaccesibles a la depleción, células de memoria central y tejido específico pueden ser algunos de los actores que están interviniendo en nuestros modelos ensayados ²⁸⁹⁻²⁹¹. Por el contrario, analizando el impacto de la depleción de la población linfocitaria T CD4 en el esquema de inmunización pasiva, también se evidencian mecanismos compensatorios o redundantes en la respuesta protectora siendo que en el receptor naive el único factor de protección presente son los esplenocitos transferidos.

Parte de estos resultados puede explicarse por una redundancia y robustez de la respuesta inmune frente a *B. pertussis* en este modelo. El solo hecho de que una cantidad de esplenocitos inmunes equivalente a $\frac{1}{4}$ de bazo conceda igual nivel de protección que el equivalente a 1 bazo entero frente al desafío intranasal con *B. pertussis* nos da indicio de ello. La redundancia y robustez en la respuesta inmunológica son características ampliamente reportadas tanto en modelos experimentales como en humanos ²⁹²⁻²⁹⁴. La mayoría de los patógenos pueden ser reconocidos por múltiples sensores innatos, que a su vez pueden inducir variados mecanismos efectores antimicrobianos. Algunas razones para la existencia de estas diversas vías de reconocimiento y respuestas efectoras son que los múltiples sensores permiten una amplia "cobertura" del mundo microbiano, mientras que la diversidad y redundancia de los efectores explica la robustez de las defensas del hospedador frente a la evolución continua de patógenos ²⁹⁵. Los diferentes sensores y efectores han evolucionado para detectar y eliminar diferentes clases de patógenos, pero también la localización de estos mecanismos de defensa en distintos tejidos y compartimentos pueden dictar cuáles de éstos son inducidos frente a un determinado estímulo ²⁹⁶. La resistencia o susceptibilidad de un hospedador a una determinada infección es producto de interacciones funcionales entre las diferentes vías de defensa del hospedador. Estas interacciones se han denominado cooperación, complementación y compensación. La cooperación se puede definir como el tipo de interacción donde dos (o más) vías individuales inducen de manera sinérgica el mismo mecanismo efector cuando ambas vías están activadas ²⁹⁷. La complementación es un tipo de interacción donde las vías individuales activan distintos mecanismos efectores, que se complementan entre sí para formar una unidad funcional de defensa, por ejemplo, la fagocitosis mediada por anticuerpos. La compensación es un tipo de interacción funcional que se produce cuando una de las vías de defensa del hospedador está inactivada mientras que las otras vías inducibles por la misma infección permanecen intactas. La compensación puede ocurrir a nivel de sensores o efectores. Esta heterogeneidad y compleja interacción entre los distintos mecanismos de

defensa hacen difícil el análisis de la contribución individual de las vías a la inmunidad protectora contra infecciones ²⁹⁵. En nuestro modelo de depleción sistémica de solo linfocitos T CD4 o en combinación con T CD8 y B220, podría darse el caso de que mecanismos compensatorios estén actuando para mantener la protección inalterada. Estos mecanismos, como evidenciamos más adelante, podrían ser explicados por la acción de la/s misma/s población/es en una localización diferente.

Por otro lado, sabemos que la base racional del uso de vacunas como intervención sanitaria preventiva en la salud pública, es la capacidad del sistema inmune de mantener una memoria de reconocimiento de antígenos con los que estuvo en contacto en encuentros previos. Inicialmente, había una idea consolidada sobre que la memoria inmunológica se mantenía de manera sistémica a través de la respuesta de anticuerpos de larga duración y de linfocitos T en circulación sanguínea. Se identificaron subpoblaciones heterogéneas de células T de memoria basadas en el nivel de expresión del receptor de *homing* a ganglios linfáticos (CCR7) que define una población de linfocitos T de memoria central (T_{cm}) y una población de linfocitos T de memoria efectora (T_{em}) ²⁹⁸. Posteriormente las investigaciones en modelos murinos mostraron una distribución diversa de linfocitos T de memoria en diferentes sitios anatómicos, incluidos órganos linfoides secundarios, mucosas y tejidos de barrera ^{299,300}, lo que ya es ampliamente aceptado como un mecanismo de vigilancia inmunológica continua. Luego, nuevos estudios en modelos murinos demostraron que las subpoblaciones T_{em} tanto CD4 como CD8 permanecen residentes en tejidos como pulmón, piel e intestino mucho tiempo después de haber sido resuelta una infección ³⁰¹⁻³⁰³. Estos estudios determinaron las bases para la designación de una nueva población de linfocitos T de memoria residentes de tejido (T_{rm}) que proporciona inmunidad protectora localizada y de inmunovigilancia en los mismos. Esta retención de linfocitos T de memoria en tejidos se mantiene de manera independiente a sus contrapartes en circulación, fenómeno que se ha demostrado por variados métodos experimentales, como, por ejemplo, la cirugía parabiótica ³⁰³⁻³⁰⁷, la marcación de células *in vivo* ^{303,308}, el uso de drogas inhibitorias del tráfico linfocitario ^{309,310}, el trasplante de tejidos ³¹¹ y, como en nuestros ensayos, la depleción de linfocitos T ³¹². En humanos, se ha demostrado la presencia de poblaciones T_{rm} análogas a las murinas gracias al estudio de muestras de pacientes trasplantados y bajo tratamiento oncológico con anticuerpos depletantes ³¹³⁻³¹⁵.

Si bien el descubrimiento y caracterización de los linfocitos T_{rm} se ha ido desarrollando desde el año 2000, fue durante el transcurso de esta tesis que los primeros reportes de la relevancia de esta población en la infección y vacunación por *B. pertussis* cobraron importancia ^{212,213}. En este mismo tiempo nuestro grupo demostró la capacidad de nuestro candidato vacunal de inducir dicha población

linfocitaria en pulmón ³³. Con los resultados presentados en este Capítulo podemos inferir que, las poblaciones linfocitarias residentes en pulmón generadas por la vacunación con nuestro candidato vacunal y al igual que la vacuna wP, son suficientes para la protección contra la infección por *B. pertussis* en el modelo murino.

Es interesante tener presente que los mecanismos de protección frente a la infección por pertussis en el modelo murino han sido siempre los mismos, pero que ha sido el avance científico y el desarrollo de nuevas tecnologías los que han permitido el desglose de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y la profundización de los mecanismos efectores responsables.

Por otro lado, destacando todas las ventajas y lo valioso del estudio en modelos animales, no se debe dejar de mencionar las propias y lógicas limitaciones. La utilización de los modelos animales, si bien es posible controlar muchas variables, generalmente se basan en un conjunto limitado de lecturas. Además, los aspectos característicos de la biología de los animales utilizados pueden impedir generalizaciones a otras especies. Por ejemplo, *B. pertussis* no es huésped natural de ratones, el modelo experimental más ampliamente usado en el estudio de esta enfermedad, y por lo tanto es difícil analogar muchas de los resultados obtenidos al humano, como la sintomatología, la transmisión y correlación de protección, entre otros.

Con los resultados obtenidos en este Capítulo podemos concluir entonces que una población linfocitaria de memoria residente local en los pulmones, inducida por la vacunación con las tres vacunas evaluadas, es indispensable para la protección en el modelo murino de infección con *B. pertussis*.

Sería importante seguir profundizando este conocimiento en el modelo murino: con más ensayos de depleción discriminando las distintas poblaciones linfocitarias por separado, la identificación de dichas poblaciones con marcadores de residencia y memoria en tejidos y la remoción de dichas poblaciones durante el montado de la respuesta inmune a la vacunación son algunos de los proyectos planteados para el futuro cercano.

CAPÍTULO 2

ACTIVACIÓN DEL INFLAMOSOMA COMO UNO DE LOS MECANISMOS DE LA RESPUESTA INNATA DESENCADENADO POR LAS BpOMVs

*“Und verloren sei uns der Tag, wo nicht Ein Mal getanzt wurde! Und falsch heisse uns jede Wahrheit,
bei der es nicht Ein Gelächter gab!”*

Friedrich Wilhelm Nietzsche

Introducción

En este Capítulo nos centraremos en la evaluación de la capacidad de nuestro candidato vacunal para activar una de las vías de la respuesta inmune innata, los inflamosomas. Para contextualizar los resultados alcanzados nos parece importante repasar algunos aspectos clave de la respuesta inmune innata y de su rol en el perfilamiento de la respuesta inmune adaptativa mediada por células T y B.

En el contexto de una infección o de la vacunación, la respuesta inmune comienza con el reconocimiento de patrones moleculares conservados derivados de patógenos (PAMPs) y de señales de daño tisular por parte del hospedador (DAMPs). Tanto los PAMPs como DAMPs interactúan con receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) ^{316,317}. Este reconocimiento de PAMPs y DAMPs por los PRRs conduce a la inducción de programas pro-inflamatorios y antimicrobianos que activan células inmunes innatas, además de contextualizar el ulterior montado de la respuesta inmunitaria adaptativa en función de las citoquinas presentes ³¹⁸. Además de la producción de citoquinas y quimoquinas, las células presentadoras de antígenos (APCs) profesionales maduran en respuesta al reconocimiento de estos ligandos ³¹⁹. Las actividades que realizan estas células para diferenciar los linfocitos T naive a sus contrapartes efectoras y de memoria ³¹⁹ pueden agruparse en tres categorías: la presentación de antígenos en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) al receptor TCR de los linfocitos T ^{320,321}; el aumento de la expresión en la superficie celular de moléculas coestimuladoras, como CD80 y CD86 ³²²; y la liberación de citoquinas que pueden actuar directamente sobre las células inmunes adaptativas para formatear una respuesta inmune ³²³. Los linfocitos B por su parte se activan por reconocimiento de antígenos de manera dependiente o independiente de linfocitos T ³²⁴.

La activación de los TLRs, que son los PRRs más estudiados, tras la detección de PAMPs y DAMPs conduce a la formación de un gran centro organizador supramolecular citoplasmático (SMOC por sus siglas en inglés) llamado Myddosoma, cuya función efectora principal es promover la activación de factores de transcripción pro-inflamatorios de la familia de NF- κ B y AP-1 ^{316,325}. Estos factores de transcripción inducen la expresión de numerosos genes importantes para la inflamación y la inmunidad adaptativa ³¹⁷.

La familia de la citoquina de IL-1, sin embargo, difiere de este paradigma de expresión y secreción acoplada. Mientras que la mayoría de las quimoquinas y citoquinas dependientes de

receptores TLRs se secretan a través de la vía convencional de secreción de proteínas, que incluye el tráfico vesicular intracelular, las citoquinas de la familia IL-1 no contienen una señal de secreción N-terminal y se producen como factores inactivos (pro-citoquinas). Sólo se liberan después de que la célula experimenta un segundo estímulo o señal 2. ³²⁶⁻³²⁹. Existen varias familias de PRRs que inducen esta segunda señal que permite la liberación de las citoquinas de la familia IL-1: las proteínas que contienen repeticiones ricas en leucina que se unen a nucleótidos (NLRs), los receptores similares a AIM2 (ALRs) y la proteína Pirina ^{330-335,336}. En particular los NLRs, ALRs y Pirinas son responsables de la detección de PAMPs y DAMPs en los compartimentos citosólicos y nucleares, y tras su detección inducen la formación de un SMOC llamado inflamosoma, que incluye sensores, proteínas adaptadoras y enzimas Caspasas. Tras la activación de los sensores del inflamosoma, la proteína adaptadora ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) se ensambla en grandes fibras helicoidales que interactúan entre sí y sirven como una plataforma de señalización supramolecular denominada “*speck*” ³³⁷. El reclutamiento de pro-Caspasa-1 a ASC promueve la activación autocatalítica de Caspasa-1. Estos *specks* pueden observarse cuando alcanzan un tamaño de alrededor de 1 μm y en la mayoría de las células solo se forma un *speck* tras la activación del inflamosoma. La formación de *specks* de ASC se utiliza frecuentemente como lectura de activación del inflamosoma ³³⁸.

Los inflamosomas inducen la activación de la enzima Caspasa-1, que escinde y por ende activa las pro-formas de IL-1 β e IL-18, como así también la proteína citosólica formadora de poros llamada Gasdermina-D (GSDMD) ³³⁹⁻³⁴¹. Tras la escisión del extremo N-terminal de GSDMD, estos fragmentos oligomerizan en forma de anillo y se insertan en la membrana plasmática formando un poro ³⁴²⁻³⁴⁵. GSDMD permeabiliza la membrana celular y debido al desequilibrio iónico y la consecuente lisis osmótica puede desencadenar una forma de muerte celular programada inflamatoria llamada piroptosis ^{346,347}. Es interesante señalar que el daño a la membrana plasmática no resulta inevitablemente en la muerte celular, ya que se ha observado que la entrada de iones Ca^{++} desde el medio extracelular desencadena programas de reparación que implican la endocitosis de la porción dañada de la membrana o su desprendimiento en forma de ectosomas ³⁴⁸⁻³⁵¹. Este último mecanismo se basa en los componentes de los complejos ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport). Es por esto que en ausencia de lisis celular, la liberación de citoquinas IL-1 β e IL-18 madura, IL-1 α y otros componentes intracelulares como Caspasa-1, a través de los poros de GSDMD (vía no convencional de secreción de proteínas), es factible ^{343,352-355}.

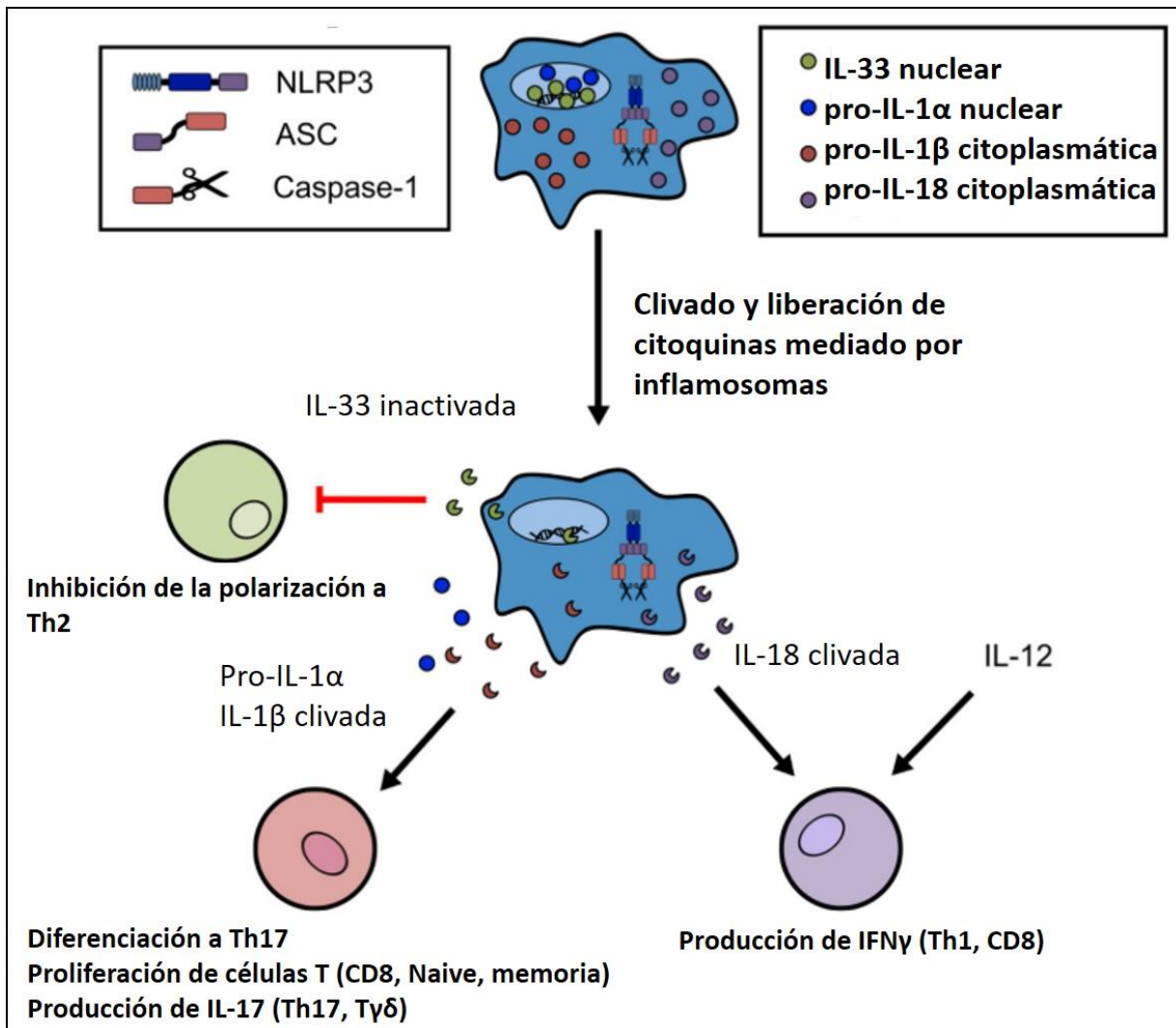
La disminución de la concentración intracelular de iones potasio (K^+) debido al flujo de los mismos a través de los poros de GSDMD es una de las señales de activación de NLRP3^{356,357}. Recientemente se ha demostrado que la disminución del K^+ intracelular induce un cambio estructural estable en NLRP3, promoviendo una conformación abierta como paso previo a su activación. Este cambio conformacional habilita una estructura que promueve la oligomerización de ASC³⁵⁸.

La activación del inflamosoma por el ADN de doble cadena ocurre a través del sensor AIM2³⁵⁹⁻³⁶² que interacciona con la proteína adaptadora ASC desencadenando así la activación de Caspasa-1^{333,334}.

Más recientemente, se describió un nuevo mecanismo de activación del inflamosoma que por presentar eventos que difieren de los anteriormente mencionados, se denominó vía de activación “no canónica” del inflamosoma. En este mecanismo está involucrada la enzima Caspasa-11 en ratones o sus ortólogas Caspasas-4/5 en humanos, y detectan el LPS, principal componente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas³⁶³. El LPS extracelular es reconocido por el receptor TLR4 y estimula la transcripción de distintas citoquinas. Si bien gran parte de las bacterias Gram-negativas son extracelulares, muchas invaden las células de su hospedador y el LPS puede acceder entonces al citoplasma desde las vacuolas en las que estas bacterias se contienen. Estudios bioquímicos han revelado que las Caspasas-11/4/5 son receptores *per se* de LPS^{340,364}. La unión directa del LPS induce la oligomerización y activación de las caspasas, las cuales escinden a GSDMD desencadenando la formación de poros en la membrana plasmática, lo que puede llevar a la muerte celular por piroptosis³⁶⁵ y/o a la activación de Caspasa-1 por NLRP3 debido al flujo de K^+ , que escinde y activa a IL-1 β e IL-18^{340,366}.

En el contexto de una infección, el requisito previo esencial para la función del inflamosoma AIM2 y Caspasa-11 es el acceso del ADN y/o LPS bacteriano al citosol. Se ha demostrado que la integridad bacteriana puede ser desarticulada gracias a los miembros de la familia de los IFNs de tipo I que estimulan la expresión de la gran familia de GTPasas inducibles por interferón que incluye tanto las GTPasas relacionadas con la inmunidad (IRGBs) como las proteínas de unión a guanilato (GBPs)^{365,367,368}. Las GBPs e IRGs funcionan en la inmunidad celular autónoma y se ha demostrado que se dirigen a los patógenos vacuolares y citosólicos destruyendo las membranas vacuolares y/o patógenas permitiendo el acceso de distintos PAMPs y DAMPs a los sensores citosólicos, por ejemplo, el LPS a Caspasa-11^{369,370,379,380,371-378}.

Otra manera por la cual el LPS y ADN bacteriano pueden acceder al citosol de la célula hospedadora es por la secreción de OMVs³⁸¹⁻³⁸³. Fue demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que OMVs de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) son internalizadas por endocitosis y el LPS contenido en los endosomas tempranos se libera al citosol quedando así accesible para interactuar y consecuentemente activar a la Caspasa-11³⁸⁴. También se evidenció el rol de GBP2 en el sensado de LPS presente en OMVs de *E. coli*, la posterior activación de Caspasa-11, secreción de IL-1 β y piroptosis³⁸². La activación del inflamosoma



Representación 14. Inflamosomas y perfilado de la respuesta inmune adaptativa T. Los inflamomas son vías innatas que orquestan los perfiles adaptativos Th1 y Th17 e inhiben el Th2. Adaptado de Evavold & Kagan 2018.

por OMVs de *Pseudomonas aeruginosa* depende de Caspasa-11 murina y Caspasa-5 humana mientras que las OMVs de *Helicobacter pylori* no inducen el mismo mecanismo³⁸⁵. Santos et al. demostraron en macrófagos *in vitro* e *in vivo* que la activación del inflamosoma inducida por OMVs de *E. coli* requiere de la señalización por TLR4-TRIF, la producción de interferones de tipo I y la acción de GBPs. Mecanísticamente, las GBPs isopreniladas se asocian al LPS presente en la superficie de las OMVs habilitando así la activación de Caspasa-11³⁸⁶. La señalización de interferones de tipo I iniciada por el reconocimiento de LPS por TLR4-TRIF y/o por el reconocimiento de ADN por cGAS/STING asegura la expresión adecuada de componentes del inflamosoma no canónico, como Caspasa-11, GBPs e IRGs³⁸⁷⁻³⁸⁹.

En relación a pertussis, es escasa la literatura respecto de la implicancia del inflamosoma en la respuesta inmune a la infección y vacunación. En el modelo murino de infección intranasal con *B. pertussis*, Dunne et al. demostraron que la infección resulta exacerbada en ratones deficientes para el receptor de IL-1, y que DCs secretan dicha citoquina al ser estimuladas con la toxina ACT de manera NLRP3 y Caspasa-1 dependiente. Este mecanismo sería el responsable de la generación de células Th17 antígeno específicas protectoras contra *B. pertussis*¹⁹¹. Por otro lado, también se ha evidenciado que la secreción de IL-1 β independiente de Caspasa-1 y su señalización por IL-1R son críticos para el *clearance* bacteriano y para la inmunidad conferida por la vacunación con la vacuna comercial wP³⁹⁰. Kroes et al. más recientemente han demostrado la activación del inflamosoma dependiente de NLRP3 en monocitos humanos de sangre periférica infectados y su rol en la activación de la respuesta protectora de células NK²⁰⁰. El factor de virulencia PT a través de su actividad ADP-ribosiltransferasa induce la síntesis de pro-IL-1 β en células mieloides vía señalización por TLR4 y el clivaje y secreción de la misma se debe a la activación del sensor del inflamosoma pirina³⁹¹.

En vacunología es importante conocer las vías o mecanismos de señalización de la respuesta inmune innata que desencadena la inmunización, ya que ésta es la que modula y activa las características, perfiles y duración de la respuesta inmune adaptativa que confiere protección frente a un determinado patógeno. La respuesta inmune adaptativa protectora anti-pertussis montada por la vacunación y caracterizada parcialmente en el Capítulo 1, genera una respuesta protectora adaptativa contra *B. pertussis* basada en anticuerpos, perfil Th1/Th17 sistémico y Trm local de memoria, pero las investigaciones sobre las vías innatas que posibilitan dicho montaje adaptativo son aún escasas. Los inflamosomas son algunas de las vías innatas que orquestan los perfiles adaptativos Th1 y Th17 e inhiben el Th2 (Esquema 14)³⁹². Con este marco teórico y en base a las características bioquímicas e inmunogénicas que presentan las OMVs de *B. pertussis* nos propusimos como objetivo de este Capítulo evaluar la capacidad de las mismas de activar el inflamosoma.

2.1. Las BpOMVs son capaces de activar la vía innata del inflamósoma en distintas líneas celulares murinas y humanas.

Para evaluar si las OMVs derivadas de *B. pertussis* son capaces de activar el inflamósoma, realizamos experimentos *in vitro* en células monocíticas macrofágicas humanas de la línea THP-1, las cuales fueron estimuladas con 4 concentraciones distintas de BpOMVs (200, 400, 800 y 1000 ng/mL). Luego de una incubación ON determinamos los niveles de hIL-1 β en el sobrenadante de cultivo. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura 9. En dicha figura se puede observar que las BpOMVs son capaces de estimular la secreción de hIL-1 β , de manera dependiente de la dosis de BpOMVs empleada. Específicamente, se observó que a partir de la concentración de 400 ng/mL de BpOMVs, la secreción de hIL-1 β fue significativamente superior al control no estimulado (Figura 9A). Paralelamente evaluamos la capacidad de las BpOMVs de inducir piroptosis. A tal efecto, determinamos la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de cultivo de células THP-1 estimuladas con 400,

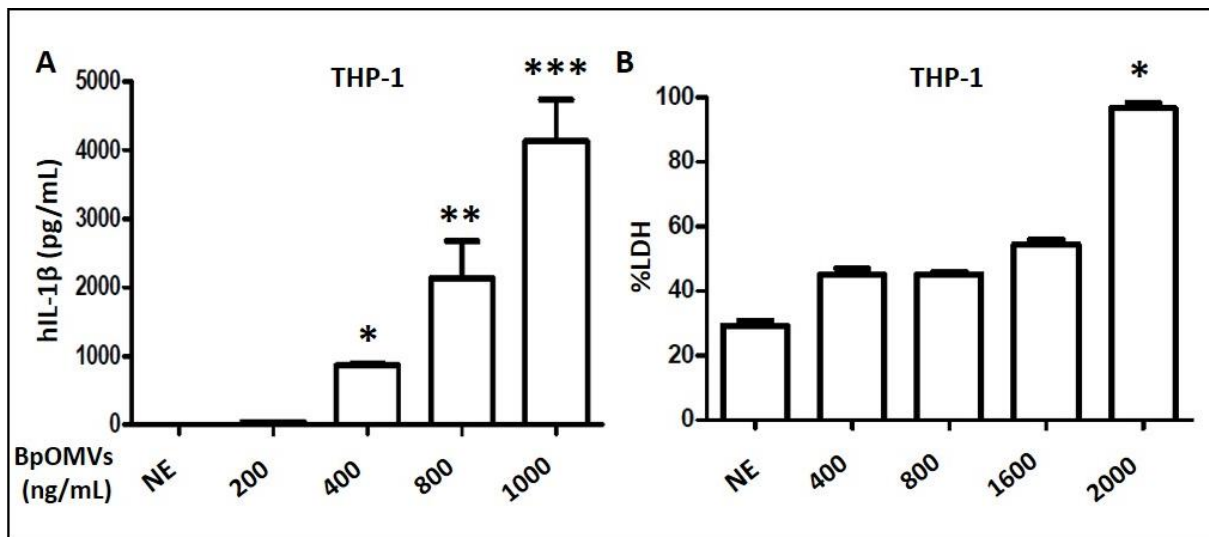


Figura 9. Las BpOMVs son capaces de activar el inflamósoma en la línea THP-1. Células THP-1 fueron estimuladas con cantidades crecientes de BpOMVs: medida de secreción de hIL-1 β (A) y actividad lactato deshidrogenasa (LDH) (B) en sobrenadante de cultivo. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$).

800, 1600 y 2000 ng/mL de BpOMVs. Como se muestra la Figura 9B, la actividad LDH sólo resultó ser diferencial al control sin estimular a la concentración de 2000 ng/mL de BpOMVs ($p < 0.05$). Con el

objeto de evaluar si lo observado en las experimentaciones con las células de la línea THP-1 era extensible a otras líneas celulares, decidimos realizar los experimentos de estimulación con dos líneas monocíticas macrofágicas murinas, J774 y RAW 264.7, empleando una única concentración de BpOMVs (800 ng/mL). Evaluamos la citoquina IL-1 β , como así también otras citoquinas no relacionadas al inflamósoma como control (hIL-8, mTNF α , mL-6). En las 3 líneas celulares ensayadas, se observó un aumento significativo en la secreción de citoquinas no relacionadas al inflamósoma: hIL-8 en el caso de THP-1, mTNF α en el de J774 y mL-6 para el de RAW 264.7 (Figura 10A, B y C). Estos resultados podrían explicarse por la propia y variada composición antigénica de las BpOMVs ²⁷⁹ y, por ende, su capacidad de señalar vía distintos PRRs. En cuanto a los niveles de secreción de IL-1 β detectados en los sobrenadantes de THP-1 como de J774, estos resultaron ser significativamente mayores en comparación a la condición control no estimulada (NE) ($p < 0,01$, Figura 10A y B). Por el contrario, en el

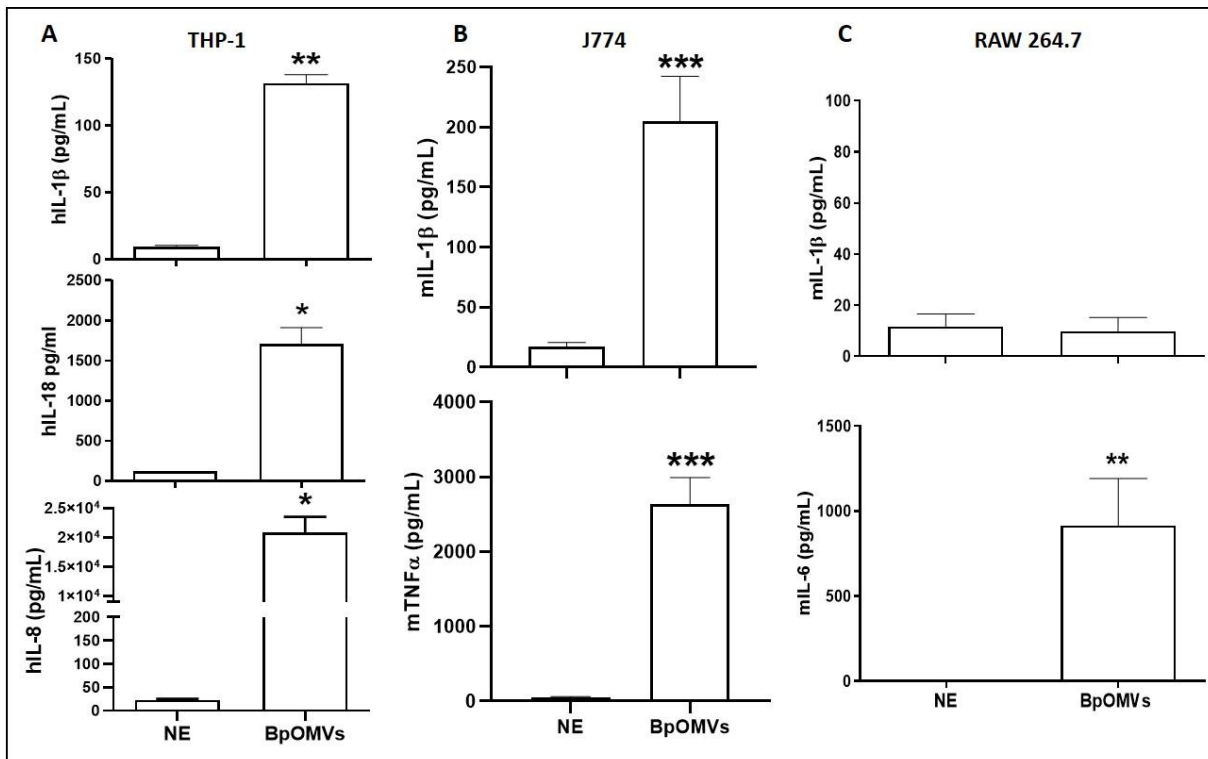


Figura 10. Las BpOMVs son capaces de activar el inflamósoma en distintas líneas celulares humanas y murinas. hIL-1 β , hIL-18 y hIL-8 en sobrenadante de cultivo de THP-1 (A); mL-1 β y mTNF α en sobrenadante de cultivo de J774 (B); mL-1 β y mL-6 en sobrenadante de cultivo de RAW 264.7 (C), luego de ser estimuladas con 800 ng/mL de BpOMVs. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

caso de la línea RAW 264.7, la secreción de hIL-1 β fue similar a la del control no estimulado (Figura 10C). Esto puede en parte explicarse por la ausencia de expresión de la proteína adaptadora ASC en dicha línea celular³⁹³. En los sobrenadantes de THP-1 también se midió la citoquina inflamosoma-dependiente hIL-18, mostrando resultados similares a los de hIL-1 β ($p < 0,05$, Figura 10A).

Habiendo evidenciado la inducción del inflamosoma por parte de las BpOMVs, decidimos avanzar en la caracterización del mecanismo de activación del mismo. Para ello, evaluamos la formación del complejo macromolecular ASC que precede a la activación del inflamosoma utilizando la línea celular reportera THP-1-ASC-GFP, donde la proteína ASC está fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP). Los experimentos llevados a cabo con esta línea celular permitieron evidenciar al microscopio la condensación y localización del complejo ASC-GFP luego del tratamiento de dichas células con BpOMVs. Como controles positivos se incubaron a las células con LPS de *E. coli* (EcLPS) durante 3 hs (*prime*) y se transfectaron con pcDNA o EcLPS con Lipofectamina como agente transfectante. A través de estos experimentos se pudo observar que el estímulo con BpOMVs indujo la relocalización y condensación de la marca verde fluorescente de manera similar a los controles positivos. Mientras que la condición no estimulada no indujo ningún tipo de expresión de ASC, la condición estimulada sólo con el *prime* de EcLPS (señal 1) indujo la expresión difusa de ASC-GFP de manera uniforme en el citoplasma de las células (Figura 11A).

El análisis cuantitativo de estos experimentos mostró que los recuentos de complejos ASC-GFP para las condiciones estimuladas con BpOMVs y los controles de EcLPS+pcDNA y Lipo+EcLPS fueron significativamente mayores a los controles no estimulado y de sólo EcLPS ($p < 0,001$, Figura 11B). Sobre esta línea celular se midieron los niveles de citoquinas hIL-1 β , hIL-18 y hIL-8 en los sobrenadantes de cultivo. En acuerdo con los resultados de microscopía se observa una secreción significativamente mayor de hIL-1 β y hIL-18 para los casos de estimulación con BpOMVs ($p < 0,01$), EcLPS+pcDNA ($p < 0,05$) y Lipo+EcLPS ($p < 0,01$) en comparación al control no estimulado (NE). Se observa también que la secreción de hIL-8 en todas las condiciones fue significativamente mayor con respecto al control ($p < 0,01$) (Figura 11C).

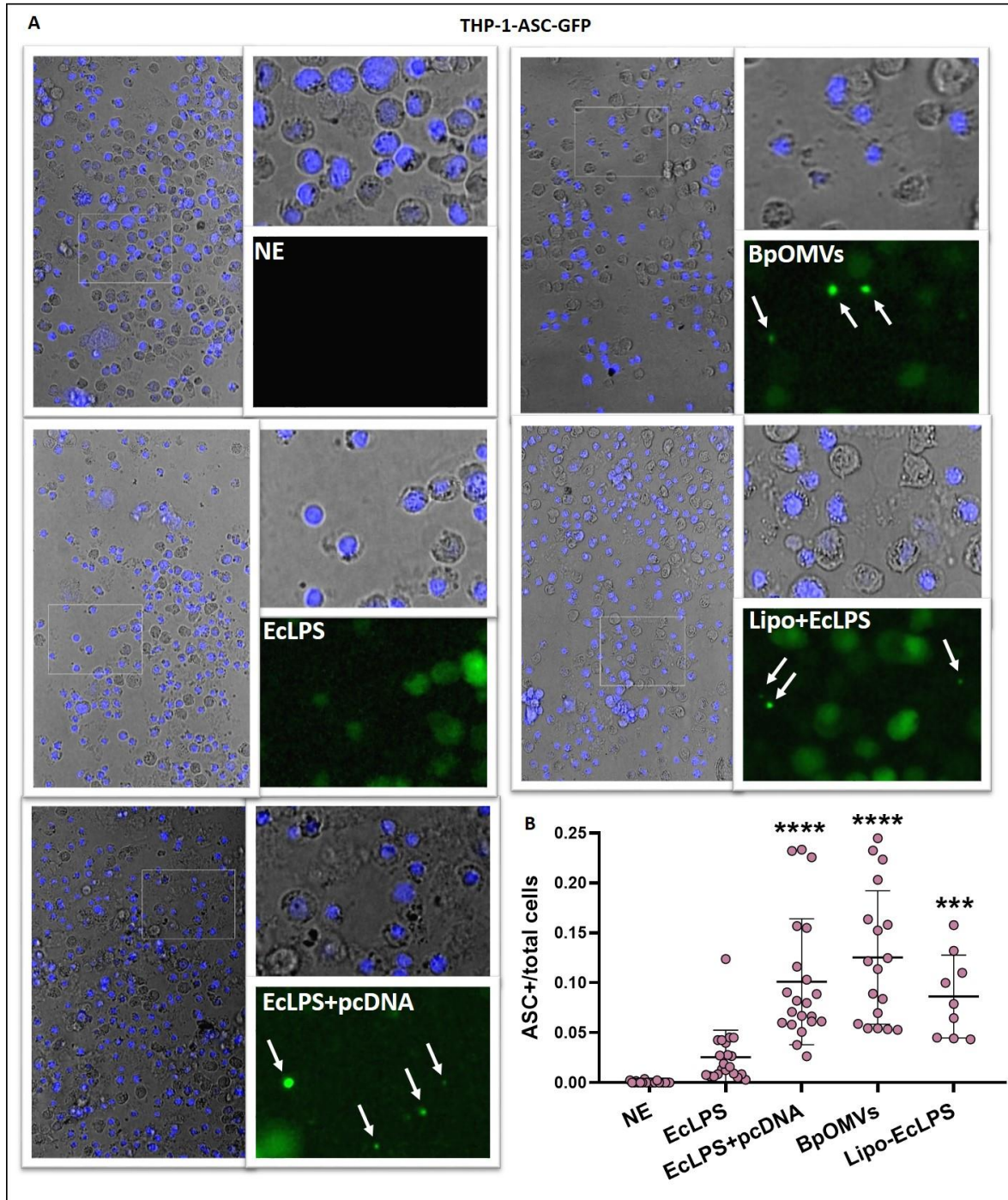


Figura 11A y B. Las BpOMVs son capaces de inducir la relocalización y condensación de la proteína ASC-GFP y de activar el inflamosoma en la línea celular THP-1-ASC-GFP. Fotografías representativas de células THP-1-ASC-GFP estimuladas con BpOMVs, EclPS, EclPS+pcDNA y Lipo+EclPS adquiridas por microscopía de fluorescencia. (A). Las flechas blancas indican los specks de ASC. Relación de células ASC-GFP+ sobre número total de células por campo de las condiciones de A (B). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$).

Todos estos resultados muestran que las BpOMVs son capaces de inducir la formación del complejo ASC y la secreción de citoquinas dependientes del inflamosoma en las distintas líneas celulares aquí ensayadas.

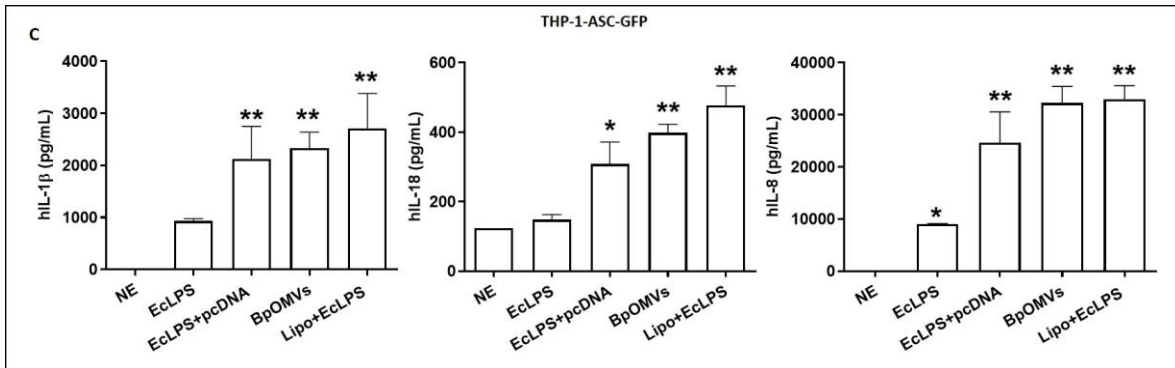


Figura 11C. Las BpOMVs son capaces de inducir la relocalización y condensación de la proteína ASC-GFP y de activar el inflamosoma en la línea celular THP-1-ASC-GFP. Medida de hIL-1 β , hIL-18 y hIL-8 en sobrenadante de cultivo de THP-1-ASC-GFP de las condiciones evaluadas en la Figura 11A y B (C). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.01$).

2.2. Las BpOMVs actúan como señal 1 y 2 de activación del inflamosoma. Dependencia del flujo de iones K⁺.

Para dilucidar cuáles son los posibles mecanismos y sensores involucrados por los cuales las BpOMVs activan el inflamosoma, trabajamos con macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de ratones de la cepa C57BL/6. En primer lugar, confirmamos que también en estas células las BpOMVs (800 ng/mL) fueron capaces de estimular la secreción de citoquinas dependientes de inflamosoma. Como controles, empleamos dos estímulos activadores del inflamosoma: *prime* + Nigericina y *prime* + transfección de pcDNA. Luego de una incubación ON se midieron los niveles de mIL-1 β y mIL-6 en los sobrenadantes de cultivo. A través de estos ensayos pudimos observar que, tanto las BpOMVs como los controles positivos indujeron una secreción de mIL-1 β en niveles que resultaron ser significativamente mayores respecto a los controles no estimulado y estimulado sólo con EclPS durante 3hs (*prime*) ($p < 0,0001$, Figura 12A, panel superior). En cuanto a secreción de mIL-6, todas las condiciones indujeron cantidades

significativamente mayores en comparación con la condición no estimulada (NE) (Figura 12A, panel inferior).

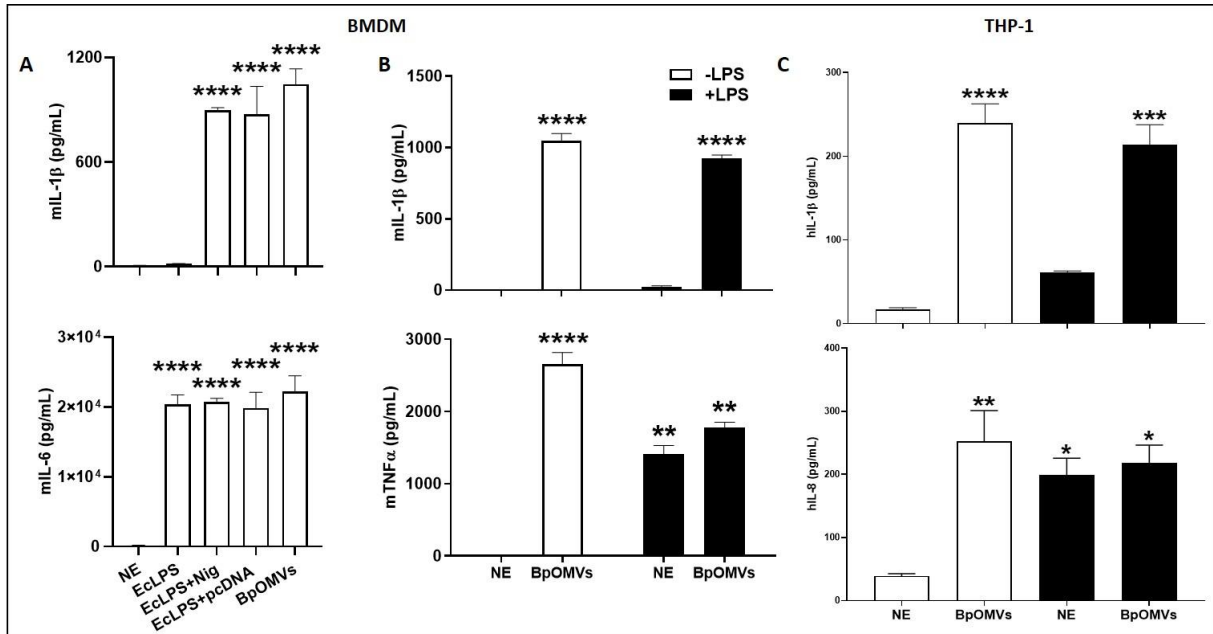


Figura 12. Las BpOMVs son señal 1 y 2 de activación del inflamosoma. Medida de mL-1β y mL-6 en sobrenadante de BMDM estimulados con BpOMVs y distintos controles positivos del inflamosoma: prime+Nig y prime+pcDNA (A). Medida de mL-1β y mTNFα en sobrenadante de BMDM estimulados con BpOMVs previo prime de EclPS por 3 hs o no (B). Medida de hIL-1β y hIL-8 en sobrenadante de cultivo de THP-1 con las mismas condiciones que en B (C). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$).

Para evaluar si las BpOMVs por sí mismas son suficientes para actuar como señal 1 y 2 en la activación del inflamosoma, estimulamos las BMDM con un *prime* y agregamos 800 ng/mL de BpOMVs. Luego de la incubación ON medimos los niveles de mL-1β y mTNFα en los sobrenadantes de cultivo. Los resultados alcanzados mostraron que no existen diferencias significativas en los niveles de secreción de mL-1β entre las condiciones de estimulación con BpOMVs con o sin *prime* previo. Estos resultados indicarían que, efectivamente, las BpOMVs actúan como señal 1 y 2 del inflamosoma (Figura 12B, panel superior). La Figura 12B, panel inferior muestra que la secreción de mTNFα fue semejante en todas las condiciones ensayadas y significativamente mayor en comparación a la condición no estimulada ($p < 0,01$). La condición de *prime* + BpOMVs presentó una menor secreción en comparación a la inducida por sólo BpOMVs, quizás como consecuencia del fenómeno denominado “tolerancia al LPS”, componente ubicuo de las BpOMVs. Este fenómeno de tolerancia descrito por Nomura et al.,

demuestra que una pre-exposición a LPS reduce la sensibilidad celular a estimaciones subsiguientes con LPS por la pérdida de expresión del receptor TLR4 en la superficie celular, hecho que correlaciona con una reducción en la actividad de unión del factor de transcripción Nf- κ B al ADN ³⁹⁴.

A modo de confirmación de que las BpOMVs actúan como señal 1 y 2 del inflamósoma también en la línea humana THP-1, realizamos el mismo tipo de experimentos recién descritos sobre esta línea. Nuevamente, no detectamos diferencias significativas en la secreción de hIL-1 β entre las condiciones de estimulación con BpOMVs, con o sin *prime* previo (Figura 12C, panel superior). En cuanto a la secreción de hIL-8, ésta fue significativamente superior en todas las condiciones evaluadas, en comparación a la condición no estimulada (Figura 12C, panel inferior).

Para verificar si la vía dependiente de los PRRs es necesaria como señal 1 en la activación inducida por las BpOMVs, empleamos la línea celular deficiente en el adaptador Myd88 (THP1-XBlueTM-MyD88Def). Esta línea celular, además, es reportera para Nf- κ B por secreción de SEAP (secreted alkaline phosphatase). Como control empleamos la línea celular WT THP1. Luego de estimular con BpOMVs y hTNF α como control positivo, ya que su señalización es independiente de Myd88, medimos en los sobrenadantes de cultivo los niveles de hIL-1 β (Figura 13A) y hIL-8 (Figura 13B) por ELISA y la actividad fosfatasa (Figura 13C). Como puede observarse en Figura 13A y B, los niveles de citoquinas en la línea deficiente en Myd88 fueron menores y comparables con la condición no estimulada. Sólo

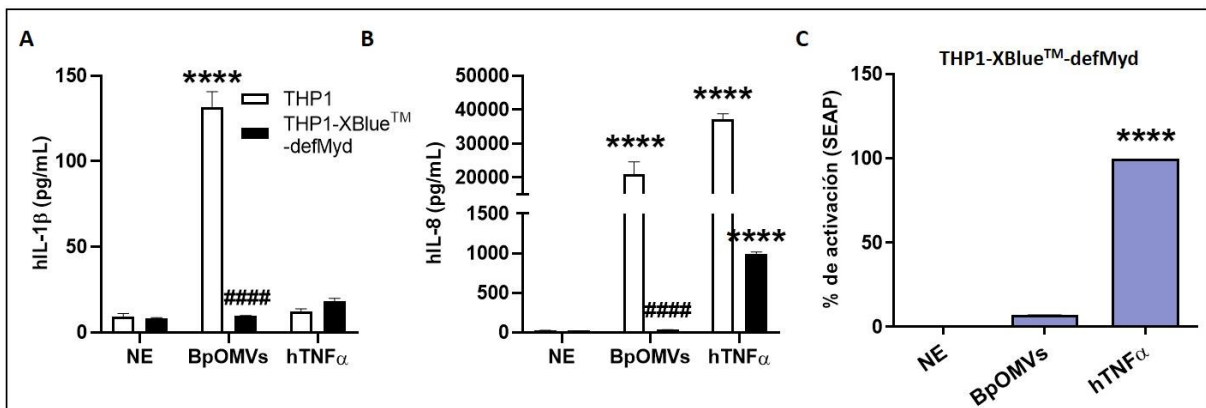


Figura 13. La activación del inflamósoma por BpOMVs depende del adaptador Myd88. Medida de hIL-1 β (A) y hIL-8 (B) en sobrenadante de cultivo de THP1 y THP1-XBlueTM-defMyD. Actividad SEAP en sobrenadante de cultivo de THP1-XBlueTM-defMyD (C). Se utilizó hTNF α como estímulo control positivo. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* p ≤0.05, ** p ≤0.01, *** p ≤0.001 y **** p ≤0.0001) y # indica un resultado significativamente diferente en comparación a su contraparte en THP-1 WT (# p ≤0.05, ## p ≤0.01, ### p ≤0.001 y #### p ≤0.0001).

para la condición estimulada con hTNF α se pudieron detectar niveles de secreción de hIL-8 significativamente mayores a los detectados en el control no estimulado ($p < 0,0001$, Figura 13B). En cuanto a actividad SEAP, únicamente en la condición estimulada con hTNF α se detectó actividad enzimática que resultó ser significativamente mayor en comparación al control no estimulado ($p < 0,0001$, Figura 13C). Este resultado contrasta con lo observado en la línea THP-1 WT donde las BpOMVs fueron capaces de inducir la secreción de hIL-1 β y hIL-8 (Figura 13A y B). Todos estos resultados muestran que, para actuar como señal 1 del inflamosoma, las BpOMVs requieren de la señalización dependiente de Myd88.

Es sabido que la disminución de la concentración intracitosólica de iones K $^+$ debido al flujo de los mismos hacia el entorno celular es uno de los estímulos que estabilizan y facilitan la activación del sensor intracitosólico del inflamosoma, NLRP3³⁵⁸. Para evaluar si en la activación del inflamosoma por BpOMVs el flujo de K $^+$ es uno de los mecanismos involucrados, procedimos a realizar un ensayo en BMDM pretratados con una solución de KCl 80 mM. Esta concentración de KCl se mantuvo durante todo el ensayo. Luego de la estimulación, colectamos los sobrenadantes y medimos mL-1 β y mTNF α . En la Figura 14A, panel inferior se puede observar que mientras los niveles de mTNF α no se ven afectados por la presencia de K $^+$, la secreción de mL-1 β disminuyó significativamente con respecto al control sin pretratamiento con KCl ($p < 0,0001$, Figura 14A, panel superior). Esto nos indica que la activación del inflamosoma inducido por las BpOMVs se debe, al menos parcialmente, al flujo de K $^+$. A partir de los sobrenadantes de cultivo de este experimento se realizó un inmunoblotting empleando anticuerpos monoclonales específicos contra la fracción activa p20 de Caspasa-1 y la porción activa p17 de IL-1 β . En el caso del pretratamiento con KCl de los macrófagos estimulados con BpOMVs, se observó una disminución en la activación y secreción de Caspasa-1 y mL-1 β en comparación al control sin pretratamiento (Figura 14B). Estos resultados están de acuerdo con lo observado en las medidas de citoquinas por ELISA (Figura 14A). Para corroborar la ocurrencia de este mecanismo en una línea celular humana, se estimularon células THP-1 en las mismas condiciones recién mencionadas. En este caso, la secreción de hIL-1 β para la condición de pretratamiento con KCl fue prácticamente nula (Figura 14C, panel superior) comparada con la condición de estimulación con BpOMVs sin pretratamiento. En cuanto a la secreción de hIL-8, en ambas condiciones de tratamiento con BpOMVs, con o sin tratamiento previo con KCl, hubo un aumento significativo de la misma en comparación con la condición no estimulada o con sólo tratamiento con KCl (Figura 14C, panel inferior).

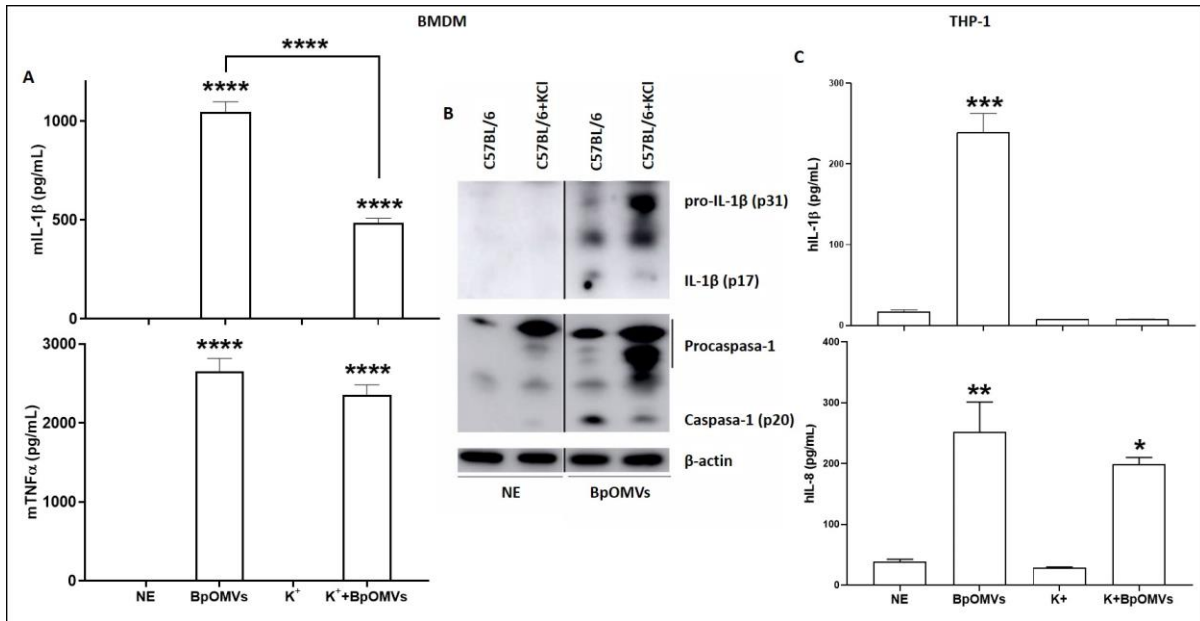


Figura 14. La activación del inflammasoma por BpOMVs depende parcialmente del flujo de iones K⁺. Medida de miL-1β (A, panel superior) y mTNFα (A, panel inferior) en sobrenadante de cultivo de BMDM estimulados con BpOMVs y pre-tratados o no con KCl 80mM. Western Blot (B) de los mismos sobrenadantes de A, contra Caspasa-1 activa (p20) y miL-1β activa (p17). Medida de hIL-1β (C, panel superior) y hIL-8 (C, panel inferior) en sobrenadante de cultivo de THP-1 estimuladas con BpOMVs y pre-tratados o no con KCl 80mM. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) o según indique la barra (*p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001 y ****p≤0.0001).

Todos estos resultados nos muestran que las BpOMVs funcionan como señal 1 y 2 del inflammasoma y que dicha señalización de activación es dependiente de Myd88. Además, la secreción de IL-1β que inducen las BpOMVs depende parcialmente del flujo de K⁺.

2.3. Las BpOMVs son capaces de activar la vía canónica del inflammasoma en BMDM murinos de manera dependiente de NLRP3 y Caspasa-1.

Como se ha mencionado con anterioridad, la proteína adaptadora ASC es común a varios sensores del inflammasoma, incluido NLRP3, y está asociada a la activación canónica del inflammasoma ya que permite el ensamblado de la plataforma proteica entre el sensor intracitosólico y Caspasa-1, activándose esta última y clivando así las pro-IL-1β y pro-IL-18. Teniendo en cuenta además que el flujo de K⁺ (una de las señales *upstream* NLRP3) es parcialmente necesario en la activación del inflammasoma por BpOMVs en BMDM murinos, decidimos evaluar si NLRP3 está involucrado en la secreción de IL-1β

inducida por nuestro candidato vacunal. Para ello, estimulamos BMDM deficientes en NLRP3 o Caspasa-1/11 (*Nlrp3*^{-/-}, and *Casp1/11*^{-/-} respectivamente) con BpOMVs y medimos luego de una incubación ON mL-1 β y mTNF α . Como control empleamos BMDM wild type (WT, C57BL/6). A través de estos ensayos pudimos evidenciar que la secreción de mL-1 β fue prácticamente nula en los macrófagos *Nlrp3*^{-/-} y *Casp1/11*^{-/-}, mientras que la producción de mTNF α no se vio afectada (Figura 15A). A través de ensayos de inmunoblotting de los sobrenadantes de cultivo del mismo ensayo, usando anticuerpos específicos contra la subunidad p20 de Caspasa-1 y la subunidad p17 de mL-1 β , verificamos que en el caso de los BMDM deficientes en NLRP3 no se observa activación ni secreción de Caspasa-1 ni de mL-1 β (subunidades p10 y p17 respectivamente) en comparación con los macrófagos WT (Figura 15B). En el caso de células deficientes en Caspasa-1/11, no se observó expresión de pro-Caspasa ni Caspasa-1, como así tampoco la subunidad p17 de mL-1 β (Figura 15B). Estos resultados indican la participación del sensor NLRP3 y las Caspasas-1/11 en la activación del inflamosoma inducida por las BpOMVs.

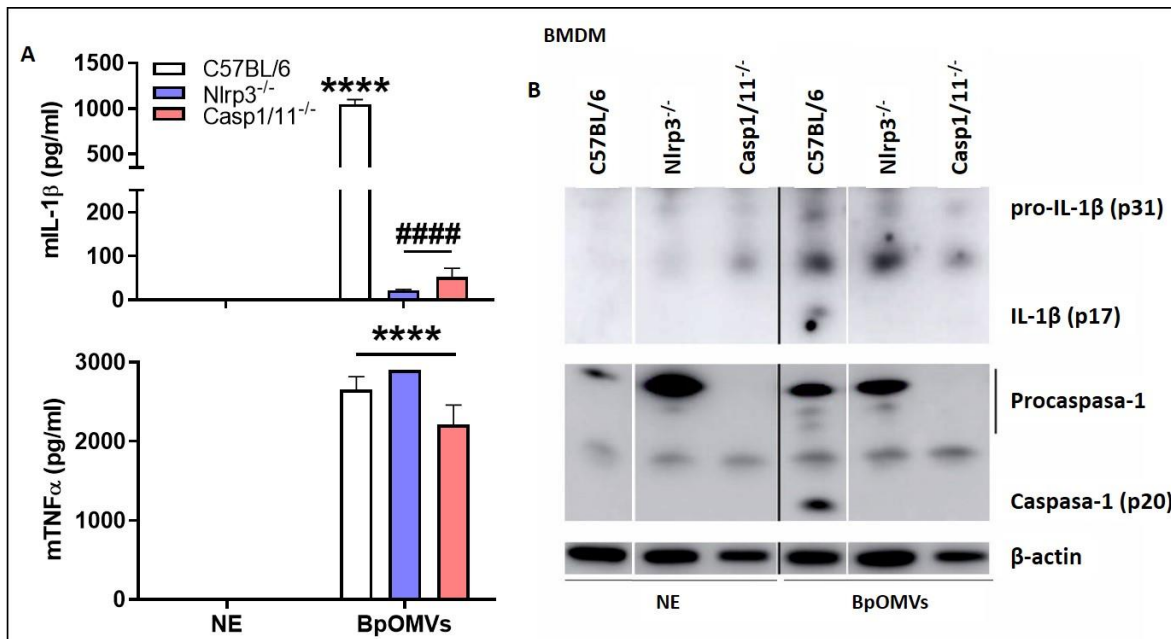


Figura 15. La activación del inflamosoma por BpOMVs depende de NLRP3 y Caspasa-1/11. Medida de mL-1 β (A, panel superior) y mTNF α (A, panel inferior) en sobrenadante de cultivo de BMDM WT, *Nlrp3*^{-/-} y *Casp1/11*^{-/-} estimulados con BpOMVs. Western Blot (B) de los mismos sobrenadantes de A contra Caspasa-1 activa (p20) y mL-1 β activa (p17). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$) y # indica un resultado significativamente diferente en comparación a su contraparte WT (# $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ y #### $p \leq 0.0001$).

2.4. Las BpOMVs son capaces de activar la vía no canónica del inflamosoma en BMDM murinos. Rol del BpLOS contenido en las BpOMVs en la activación de la misma.

Teniendo en cuenta que la secreción de mIL-1 β inducida por BpOMVs fue completamente anulada en los BMDM deficientes en Caspasa-1/11 decidimos estudiar si la vía no canónica está implicada en el mecanismo de activación del inflamosoma por nuestro candidato vacunal. Para ello trabajamos con BMDM deficientes en Caspasa-11 o GSDMD (Casp11 $^{-/-}$ y Gsdmd $^{-/-}$) los cuales fueron

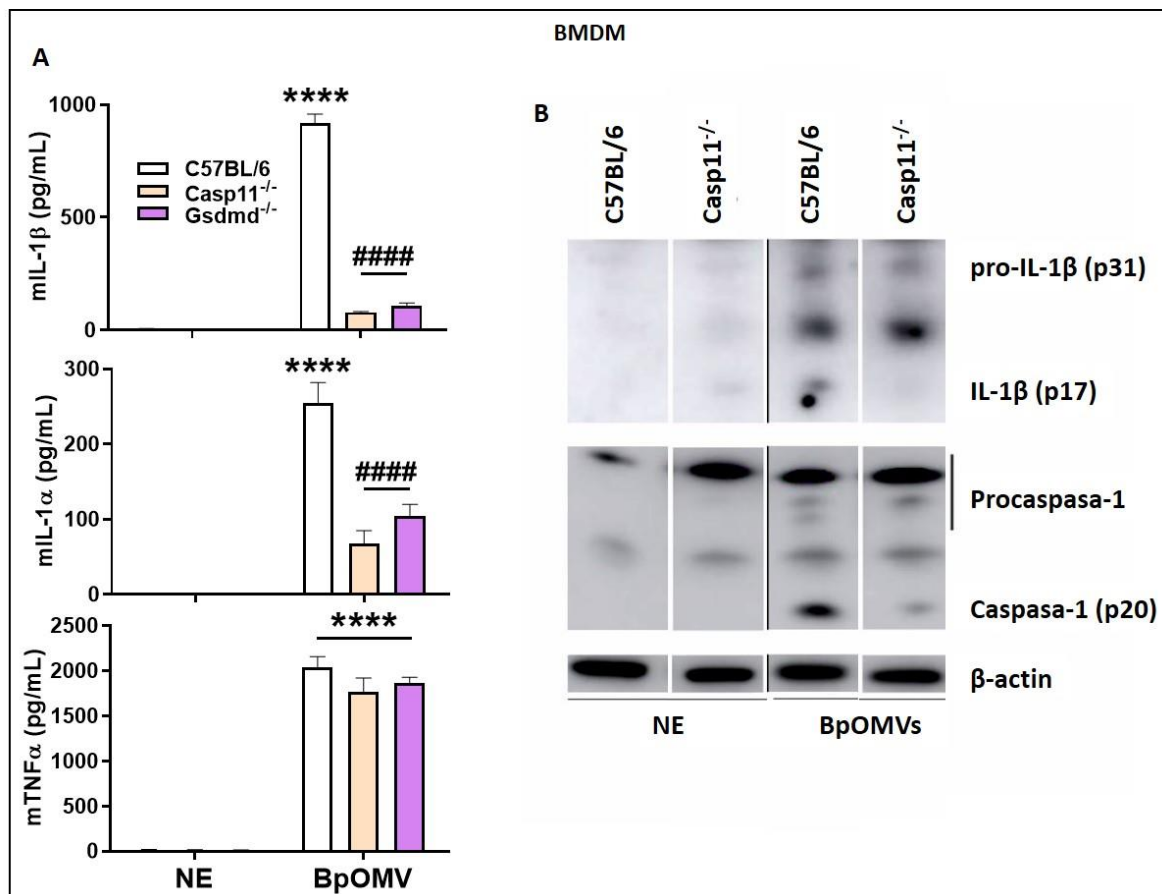


Figura 16A y B. Las BpOMVs son capaces de activar la vía no canónica del inflamosoma. Medida de mIL-1 β (A, panel superior), mIL-1 α (A, panel intermedio) y mTNF α (A, panel inferior) en sobrenadantes de cultivo de BMDM WT, Casp11 $^{-/-}$ y Gsdmd $^{-/-}$ estimulados con BpOMVs. Western Blot (B) de los mismos sobrenadantes de A contra Caspasa-1 activa (p20) y mIL-1 β activa (p17). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$) y # indica un resultado significativamente diferente en comparación a su contraparte WT (# $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ y #### $p \leq 0.0001$).

estimulados con BpOMVs (800ng/mL). Luego de la incubación evaluamos la secreción de mL-1 β , mL-1 α y mTNF α , resultados que se muestran en la Figura 16A. En dicha figura se puede observar que los niveles de mL-1 β y mL-1 α fueron significativamente menores ($p < 0,0001$) que los detectados en los sobrenadantes de BMDM WT (C57BL/6) (Figura 16A, panel superior e intermedio). Los niveles de mTNF α secretados fueron equivalentes entre las cepas deficientes y la WT (Figura 16A, panel inferior). A través de la realización de inmunoblots con anticuerpos específicos contra las porciones activas de Caspasa-1 (p20) y de IL-1 β (p17), verificamos una disminución en la detección de la subunidad p20 de Caspasa-1 y la ausencia de secreción de la subunidad p17 de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo de la cepa deficiente (Figura 16B).

Estos resultados indicarían que la Caspasa-11 podría sensar el BpLOS de las BpOMVs, activarse y clivar así a GSDMD. Considerando esta posibilidad, evaluamos si la estimulación con BpLOS transfectado con FuGENE en BMDM WT es capaz de inducir secreción de mL-1 β . Efectivamente, en comparación con los controles no estimulado, estimulados con BpLOS libre o FuGENE solo, el BpLOS transfectado indujo una secreción significativamente mayor de mL-1 β y mL-1 α ($p < 0,0001$, Figura 16C, panel superior e intermedio). Estos resultados indicarían que el BpLOS intracitosólico es probablemente sensado por Caspasa-11. El mismo estímulo sobre BMDM Nlrp3^{-/-} no indujo dichas secreciones, manteniéndose constante sólo la secreción de la citoquina inflamatoria independiente mL-12p40 (Figura 16C, panel inferior). Para comparar la capacidad del BpLOS respecto a la del EclPS de estimular la activación no canónica del inflamósoma, procedimos a realizar transfecciones de estas moléculas en BMDM WT para luego medir los niveles de mL-1 β secretados. Los resultados alcanzados mostraron que los niveles de mL-1 β fueron comparables y significativamente mayores a los controles no estimulados o estimulados con BpLOS o EclPS libres ($p < 0,0001$, Figura 16D, panel superior). En cambio, la secreción de mTNF α fue significativamente mayor en todas las condiciones evaluadas comparando con el control tratado solo con el agente transfectante FuGENE (Figura 16D, panel inferior). Es importante resaltar que en todos los casos se estimuló con 800 ng/mL de BpLOS (igualando al estímulo de BpOMVs) y con 1000ng/mL EclPS (igualando al estímulo usado en el *prime*). Se estima que las BpOMVs tienen un 10% de BpLOS, por lo que la concentración usada de BpLOS en estos tratamientos sería 10 veces mayor que la que contendría el estímulo usando 800 ng/mL de BpOMVs.

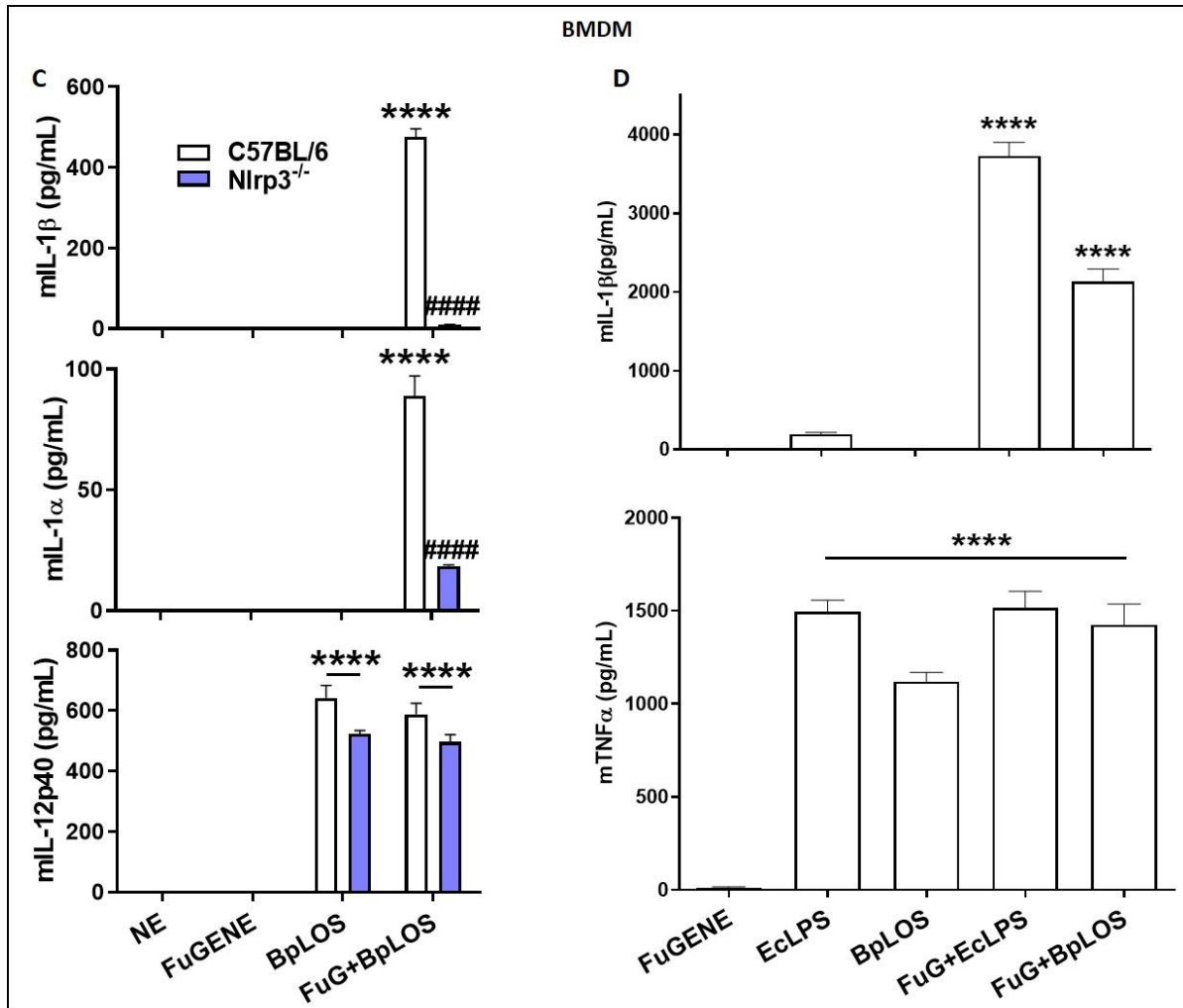


Figura 16C y D. Las BpOMVs son capaces de activar la vía no canónica del inflammasoma. Medida de mL-1β (C, panel superior), mL-1α (C, panel intermedio) y mL-12p40 (C, panel inferior) en sobrenadantes de cultivo de BMDM WT y Nlrp3^{-/-} estimulados con BpLOS libre y transfectado con FuGENE. Medida de mL-1β (D, panel superior) y mTNFα (D, panel inferior) en sobrenadantes de cultivo de BMDM WT estimulados con BpLOS y EcLPS libres y transfectados con FuGENE. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) o tratada sólo con FuGENE (*p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001 y ****p≤0.0001) y # indica un resultado significativamente diferente en comparación a su contraparte WT (#p≤0.05, ##p≤0.01, ###p≤0.001 y ####p≤0.0001).

Existen reportes que muestran que dependiendo del nivel de acilación, Caspasa-11/4/5 no reconocen los distintos LPS por igual. Por ejemplo, Caspasa-11 no reconoce el LPS tetraacilado de *F. novicida* y *Y. pestis*, pero sí reconoce el LPS hexaacilado de *E. coli*^{395,396}. EL LOS de *B. pertussis* presenta un lípido A pentaacilado que hemos demostrado puede ser reconocido por Caspasa-11. Con el objetivo de evaluar si el nivel de acilación del LOS afecta la activación no canónica del inflammasoma por las BpOMVs, realizamos la estimulación de BMDM con BpOMVs que poseen un LOS tetraacilado

(BpOMVs_{PagL}). Estas BpOMVs se obtienen de una cepa bacteriana mutante de *B. pertussis* que expresa el gen pagL de *B. bronchiseptica*, el cual codifica una lípido A 3-deacilasa y por ello este mutante resulta en la producción de un BpLOS subacilado ^{277,397}. A través de los experimentos de estimulación ya descritos, confirmamos que estos cambios en la acilación del BpLOS influyen en la activación del inflamosoma porque la estimulación con BpOMVs_{PagL}, indujo cantidades significativamente menores de mL-1 β ($p < 0,05$, Figura 17A) y de mL-1 α ($p < 0,05$, Figura 17B) en comparación con la condición estimulada con BpOMVs. Por su parte, la secreción de mL-12p40 quedó invariable (Figura 17C). En simultáneo, estimulamos BMDM deficientes en NLRP3 y nuevamente se observa la dependencia de la secreción de mL-1 β y mL-1 α con este sensor para la condición estimulada con BpOMVs. Incluso para la condición estimulada con BpOMVs_{PagL}, se observa una menor secreción de mL-1 β (no significativa) y mL-1 α ($p < 0,05$) en comparación con la cepa WT (Figura 17A y B), quedando invariable la secreción de mL-12p40 (Figura 17C).

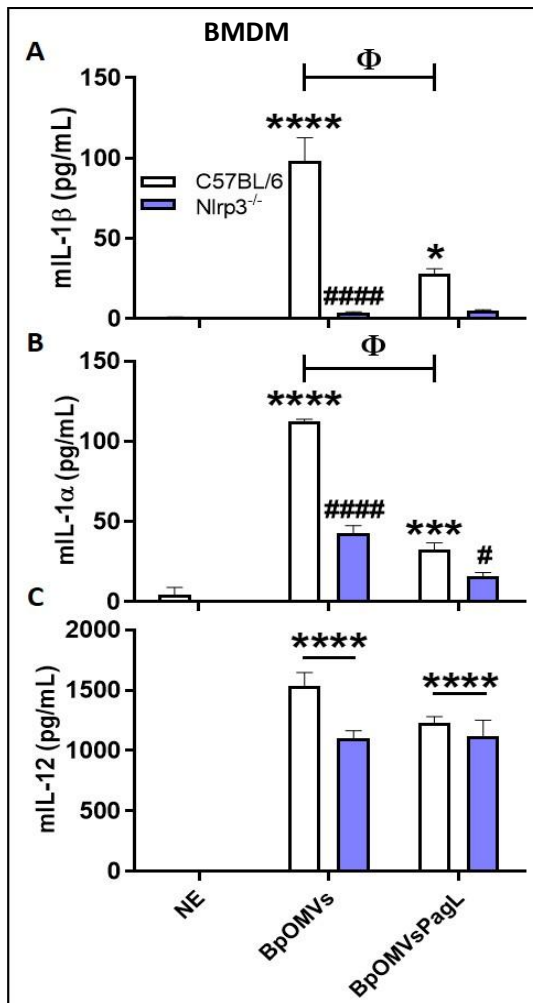


Figura 17. El grado de acilación del LOS de las BpOMVs influye en la activación del inflamosoma. Medida de mL-1 β (A), mL-1 α (B) y mL-12p40 (C) en sobrenadantes de cultivo de BMDM WT y Nlrp3^{-/-} estimulados con BpOMVs y BpOMVs provenientes de una cepa mutante de *B. pertussis* que expresa la enzima deacilasa PagL de *B. bronchiseptica* (BpOMVs_{PagL}). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ y **** $p \leq 0,0001$), # indica un resultado significativamente diferente en comparación a su contraparte WT (# $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$ y #### $p \leq 0,0001$) y ϕ indica un resultado significativamente diferente a la estimulación con BpOMVs WT ($\phi p \leq 0,05$).

Para confirmar una contribución directa del BpLOS intracitosólico en la activación no canónica del inflamosoma, realizamos transfecciones con BpLOS en BMDM C57BL/6 (WT), *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-}, *Casp11*^{-/-} y *Gsdmd*^{-/-}. Luego de la incubación ON, observamos que los niveles de mL-1 β y mL-1 α secretados resultaron ser significativamente menores ($p < 0,001$) en los sobrenadantes de los BMDM deficientes en comparación a los detectados en los de la cepa WT ($p < 0,001$, Figura 18A y B). Por su parte, los niveles de mTNF α y mL-12p40 fueron equivalentes en todas las condiciones analizadas (Figura 18C y D). Estos resultados indican que las BpOMVs pueden activar a Caspasa-11 y que el LOS derivado de las vesículas de membrana externa que accede al citosol por la internalización de las mismas, es al menos una de las señales moleculares que permite la activación del inflamosoma. Dicho proceso depende de NLRP3, Caspasa-1, Caspasa-11 y GSDMD.

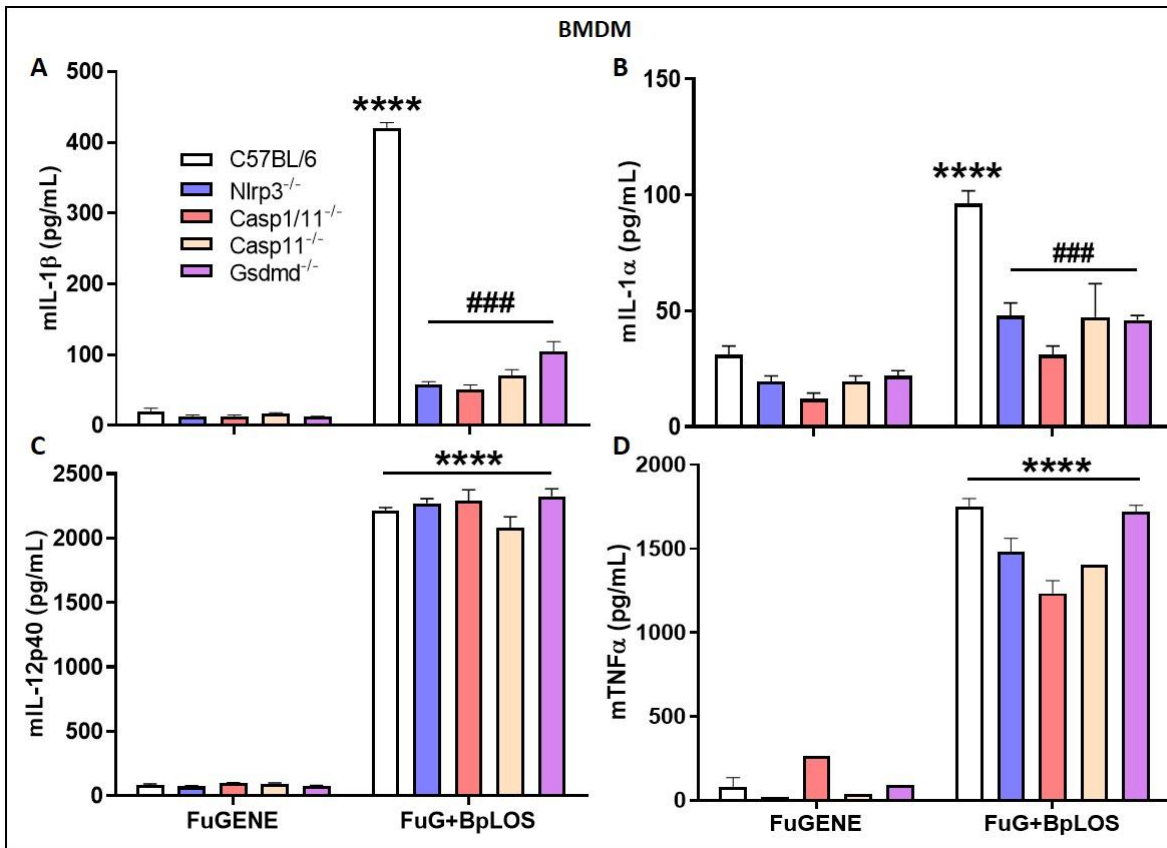


Figura 18. La activación del inflamosoma por BpLOS transfectado depende de NLRP3, Caspasa1/11, Caspasa-11 y GSDMD. Medida de mL-1 β (A), mL-1 α (B), mL-12p40 (C) y mTNF α (D) en sobrenadantes de cultivo de BMDM WT, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-}, *Casp11*^{-/-} y *Gsdmd*^{-/-} estimulados con BpLOS transfectado con FuGENE. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición tratada sólo con FuGENE (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ y **** $p \leq 0,0001$) y # indica un resultado significativamente diferente en comparación a su contraparte WT (# $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ y ### $p \leq 0,001$).

Reportes previos sugieren que la activación de Caspasa-11 por LPS citosólico requiere de proteínas de unión a guanilato (GBPs), en particular GBP2^{389,398}. Las proteínas GBPs están muy conservadas entre los vertebrados y se han identificado 7 genes GBP humanos en el cromosoma 1³¹⁷, y 11 genes en ratones, que se ubican 5 de ellos en el cromosoma 3 (GBPchr3) y los otros 6 en el cromosoma 5^{375,399–401}.

Para determinar si las GBPs están involucradas en la activación del inflamosoma por BpOMVs, estimulamos BMDM derivados de C57BL/6 WT con BpOMVs y con BpLOS libre y transfectedo. Luego de la estimulación, se determinó los niveles de expresión del ARNm de GBP1, GBP2, GBP3, GBP5 y GBP7. Para todas las condiciones analizadas, los niveles de expresión de los genes GBPs se vieron significativamente incrementados en comparación con los detectados para el control no estimulado (NE), exceptuando la expresión de GBP7. Los niveles de ARNm para GBP7 solo se vieron aumentados en la estimulación con BpLOS transfectedo con FuGENE (Figura 19A). Trabajamos además con células derivadas de una cepa murina que tiene inactivados los 5 genes GBPs del cromosoma 3 (*Gbp*^{chr3-/-}): *Gbp1*, *Gbp2*, *Gbp3*, *Gbp5*, and *Gbp7*. A partir de células de esta cepa y en comparación con los BMDM derivados de C57BL/6 WT, realizamos estimulaciones con BpOMVs y BpLOS transfectedo. Luego del periodo de incubación, realizamos las determinaciones de los niveles de mIL-1 β y mIL-1 α secretados.

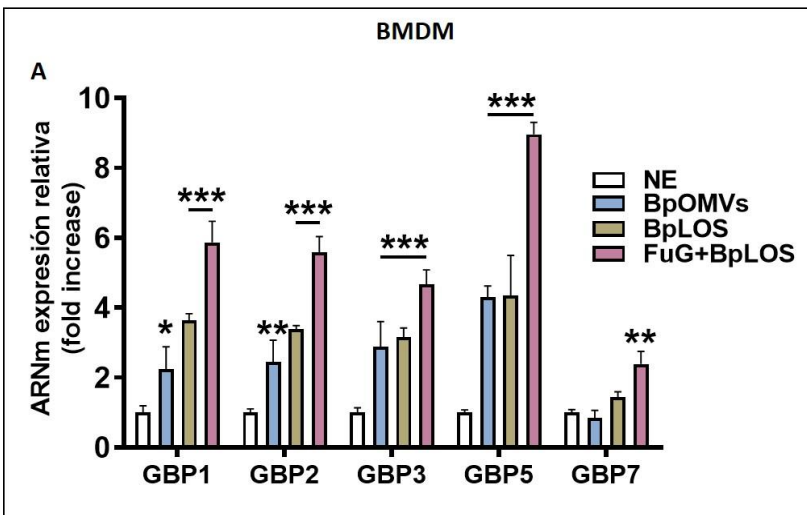


Figura 19A. Las GBPs del cromosoma 3 están involucradas en la activación del inflamosoma por BpOMVs. Medida de expresión de los genes GBPs del cromosoma 3 por qPCR en BMDM estimuladas con BpOMVs y BpLOS libre y transfectedo con FuGENE (A). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$).

Los resultados alcanzados presentados en la Figura 19B y C muestran que los niveles de ambas citoquinas se vieron disminuidos para ambos estímulos en las células provenientes de la cepa $GBP^{chr3-/-}$, mientras que los niveles de mTNF α y mL-12p40 fueron equivalentes a los detectados en BMDM WT (Figura 19By C). También analizamos el procesamiento de las formas activas de mL-1 β (p17) y de Caspasa-1 (p20) en los sobrenadantes de cultivo de BMDM $Gbp^{chr3-/-}$ por Western Blot. Los resultados alcanzados muestran que éstas fueron anuladas o disminuidas (respectivamente) en comparación con las detectadas en los sobrenadantes de las células WT (Figura 19D). Todos estos resultados demuestran que las GBPs efectivamente juegan un rol importante en la inducción y activación del inflamosoma por BpOMVs, posiblemente facilitando el acceso del BpLOS a la Caspasa-11.

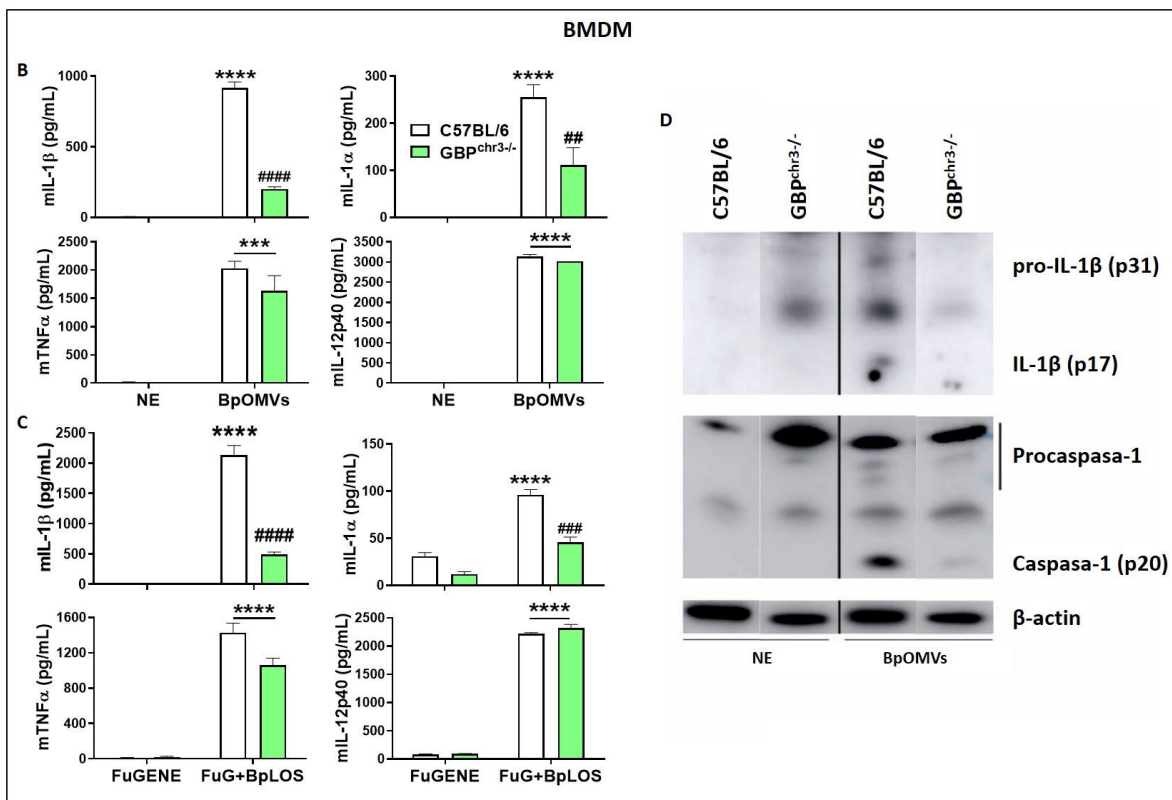


Figura 19B-D. Las GBPs del cromosoma 3 están involucradas en la activación del inflamosoma por BpOMVs. Secreción de mL-1 β , mL-1 α , mTNF α y mL-12p40 de BMDM WT y $GBP^{chr3-/-}$ estimulados con BpOMVs (B) y BpLOS transfectado con FuGENE (C). Western Blot de sobrenadantes de BMDM WT y $GBP^{chr3-/-}$ estimulados con BpOMVs contra Caspasa-1 activa (p20) y mL-1 β activa (p17) (D). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) o tratada sólo con FuGENE (* p ≤0.05, ** p ≤0.01, *** p ≤0.001 y **** p ≤0.0001) y # indica un resultado significativamente diferente en comparación a su contraparte WT (# p ≤0.05, ## p ≤0.01, ### p ≤0.001 y #### p ≤0.0001).

2.5. El BpLOS extra e intracelular no es reconocido por la línea humana THP-1.

Con el objetivo de evaluar si el mecanismo de activación no canónico del inflamosoma antes descrito ocurre en líneas macrofágicas humanas, realizamos experimentos de estimulación con BpOMVs y BpLOS o EclPS libres o transfectados, en células THP-1. Al igual que lo observado con anterioridad, la estimulación con BpOMVs o con el EclPS transfectado indujeron una secreción significativamente mayor de hIL-1 β y hIL-18 en comparación con el control no estimulado ($p < 0,01$, Figura 20A y B). Para nuestra sorpresa, el BpLOS transfectado no estimuló secreción de hIL-1 β ni de hIL-18 (Figura 20A y BC).

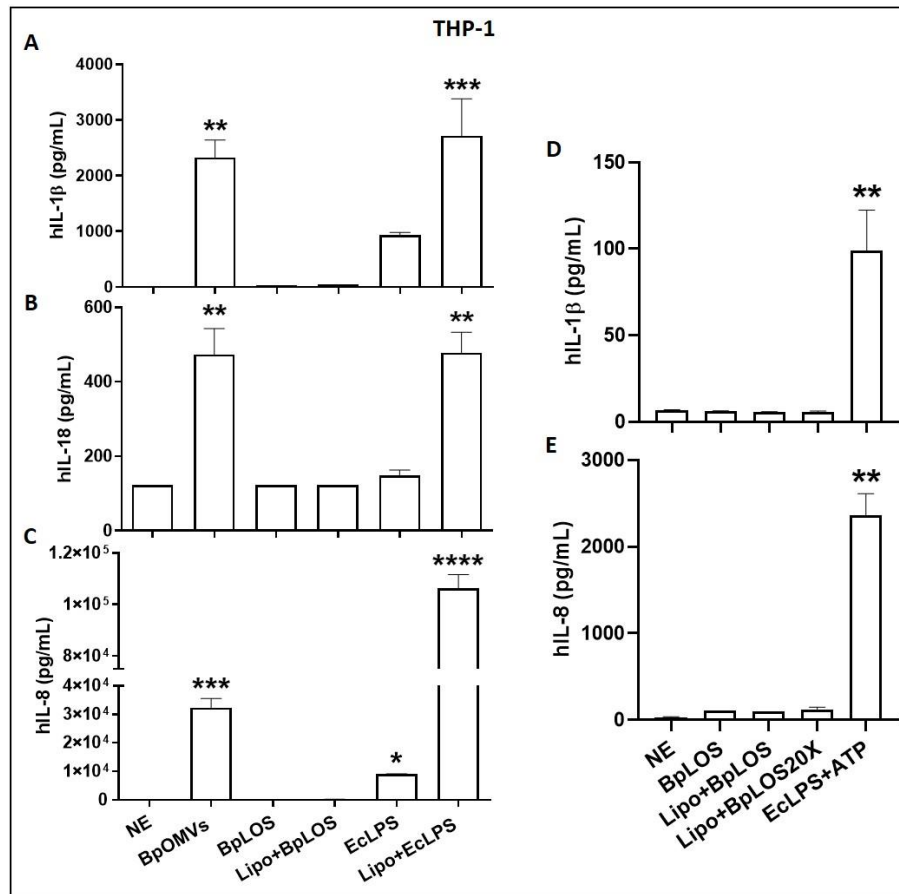


Figura 20. El BpLOS no es sentido por la línea humana THP-1. Secreción de hIL-1 β (A), hIL-18 (B) y hIL-8 (C) de células THP-1 estimuladas con BpOMVs, BpLOS y EclPS libres o transfectados. Medida de hIL-1 β (D) y hIL-8 (E) en sobrenadante de THP-1 estimuladas con 20 veces más BpLOS transfectado (Lipo+BpLOS20X) y con prime+ATP como control positivo. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

Para corroborar estos resultados, estimulamos las células transfectando con una mayor cantidad de BpLOS (20 veces más). Como control positivo realizamos un estímulo de activación canónico del inflamosoma con un *prime* + ATP. Luego de la incubación ON, determinamos los niveles de hIL-1 β y hIL-8 en sobrenadantes de cultivo. Efectivamente, a través de estos ensayos pudimos observar que tanto el hTLR4 como h-Caspasa-4/5 de THP-1 no son capaces de reconocer el BpLOS pentaacilado (Figura 20D y E).

2.6. Las BpOMVs son capaces de activar la vía canónica del inflamosoma por AIM2.

Se ha reportado que OMVs producidas por otras especies de bacterias Gram-negativas pueden llevar ADN asociado o dentro de las mismas ³⁸¹. Hasta el momento, no hay reportes sobre la presencia de ADN en las BpOMVs. El ADN doble hebra intracitosólico proveniente de patógenos o del mismo hospedador, es una señal de alarma capaz de desencadenar la activación del inflamosoma a través del sensado del mismo por AIM2 ³³³⁻³³⁵.

Como primera aproximación, para evaluar la presencia de ácidos nucleicos en sobrenadante de una suspensión de BpOMVs luego de una ultracentrifugación, realizamos lecturas a 260 nm por Nanodrop. Los resultados alcanzados, en tres repeticiones realizadas, fueron detectables (datos no mostrados). Más allá de este dato, decidimos realizar experimentaciones en BMDM deficientes en AIM2. Estimulamos las células con BpOMVs y luego de una incubación ON medimos mL-1 β , mL-1 α , mTNF α y mL-12p40 en los sobrenadantes de cultivo. Los resultados que se presentan en la Figura 21A y B muestran que la secreción de mL-1 β y mL-1 α fueron significativamente menores en el caso de la cepa deficiente en comparación con los hallados en los sobrenadantes de la cepa WT ($p < 0,001$). Por su parte la secreción de mTNF α y mL-12p40 fueron equivalentes en ambos casos (Figura 21C y D).

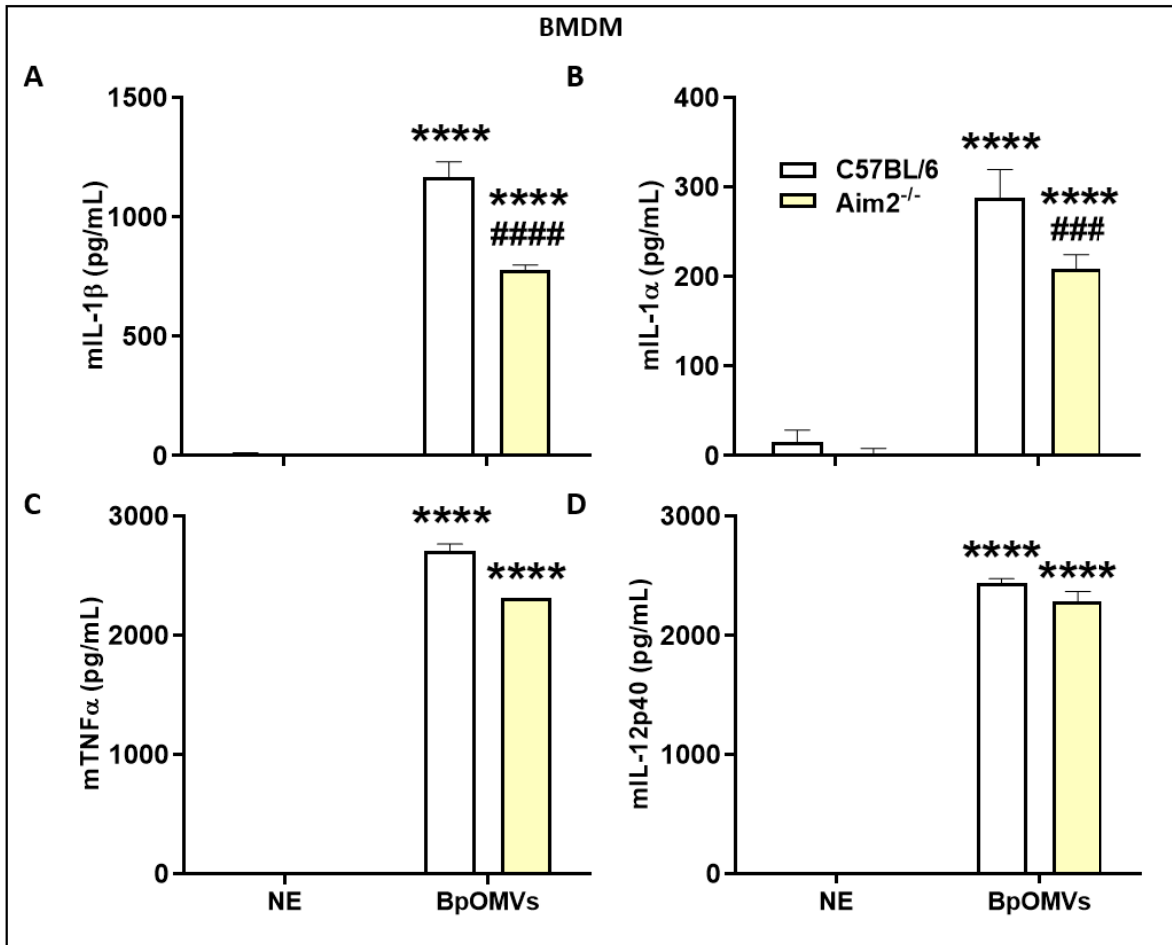


Figura 21. La activación del inflamosoma por BpOMVs depende también del sensor de ADN citosólico AIM2. Medida de mIL-1 β (A), mIL-1 α (B), mTNF α (C) y mIL-12p40 (D) por ELISA en sobrenadante de cultivo de BMDM WT y Aim2^{-/-} estimulado con BpOMVs. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$) y # indica un resultado significativamente diferente en comparación a su contraparte WT (# $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ y #### $p \leq 0.0001$).

En base a estos resultados que nos muestran que en la activación del inflamosoma por las BpOMVs existe una dependencia con el sensor citosólico de ADN AIM2, decidimos realizar una estrategia experimental mediante la cual se pueda poner en evidencia este mecanismo de activación. Repetimos los experimentos de estimulación con BpOMVs, pero antes de la misma tratamos a las vesículas con DNAsa. En acuerdo con lo observado en las estimulaciones de BMDM Aim2^{-/-}, detectamos que la secreción de mIL-1 β disminuyó significativamente para la condición de BpOMVs digeridas con DNAsa respecto a la condición de BpOMVs sin digestión enzimática previa ($p < 0,001$, Figura 22A). La

secreción de mL-6 por su parte, mantuvo sus niveles de manera similar a los detectados en la condición estimulada con BpOMVs sin tratamiento enzimático (Figura 22B).

Luego, repetimos esta estrategia en BMDM WT, Aim2^{-/-} y Nlrp3^{-/-} con BpOMVs, BpOMVs digeridas con DNAsa y BpOMVs digeridas con DNAsa y complementadas con ADN cromosomal de *B. pertussis* (BpDNA). Medimos mL-1 β en los sobrenadantes de cultivo y observamos que para el caso de los BMDM WT, la cantidad de mL-1 β disminuye en los tratamientos con DNAsa ($p < 0,0001$). En el caso de la complementación con BpDNA luego de la digestión con DNAsa (Figura 22C) se observó una reducción en la cantidad secretada de mL-1 β , pero no tan marcada como la detectada en su contraparte sin complementar (Figura 22C). Este resultado daría indicio de la posible importancia del estado en el que el ADN se encuentra asociado a las BpOMVs y cómo esto afecta el sentido por AIM2. En el caso de los BMDM deficientes para AIM2, observamos nuevamente que la secreción de mL-1 β

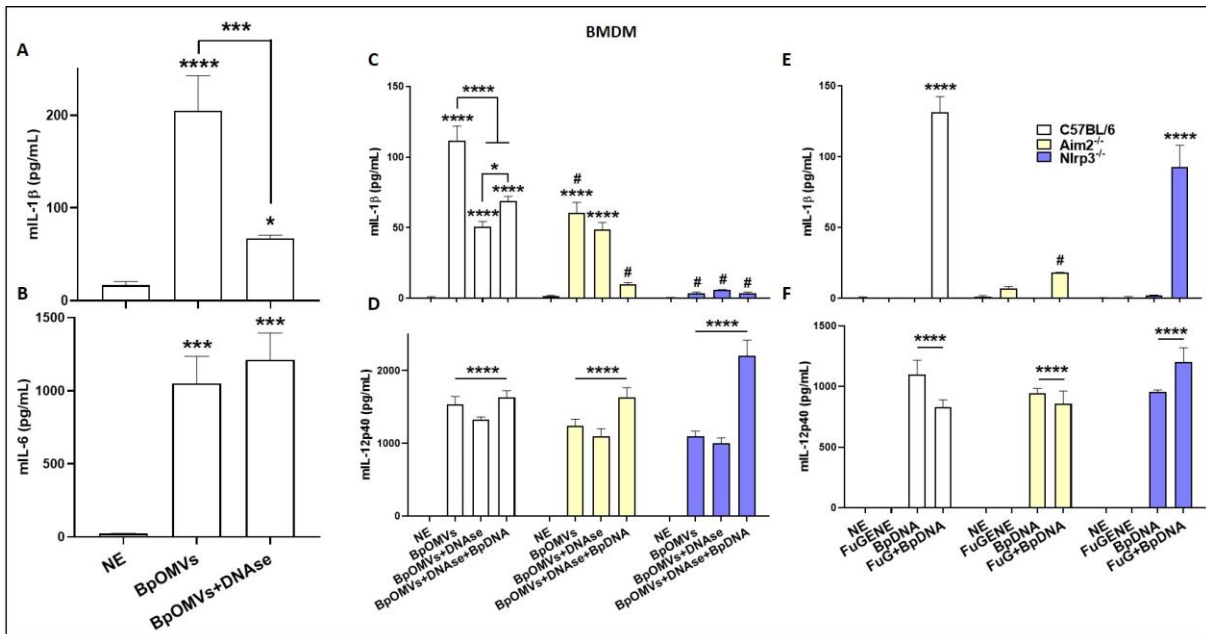


Figura 22. Las BpOMVs son capaces de activar la vía canónica del inflammasoma dependiente de AIM2. Medida de mL-1 β (A) y mL-6 (B) en sobrenadante de cultivo de BMDM estimulados con BpOMVs y BpOMVs previamente digeridas con DNAsa. Medida de mL-1 β (C) y mL-12p40 (D) en sobrenadante de cultivo de BMDM WT, Aim2^{-/-} y Nlrp3^{-/-} estimulados con BpOMVs, BpOMVs previamente digeridas con DNAsa y BpOMVs previamente digeridas con DNAsa y complementadas con BpDNA. Medida de mL-1 β (E) y mL-12p40 (F) en sobrenadante de cultivo de BMDM WT, Aim2^{-/-} y Nlrp3^{-/-} estimulados con BpDNA libre y transfectado con FuGENE. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) o según indique la barra (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$) y # indica un resultado significativamente diferente en comparación a su contraparte WT (# $p \leq 0.05$).

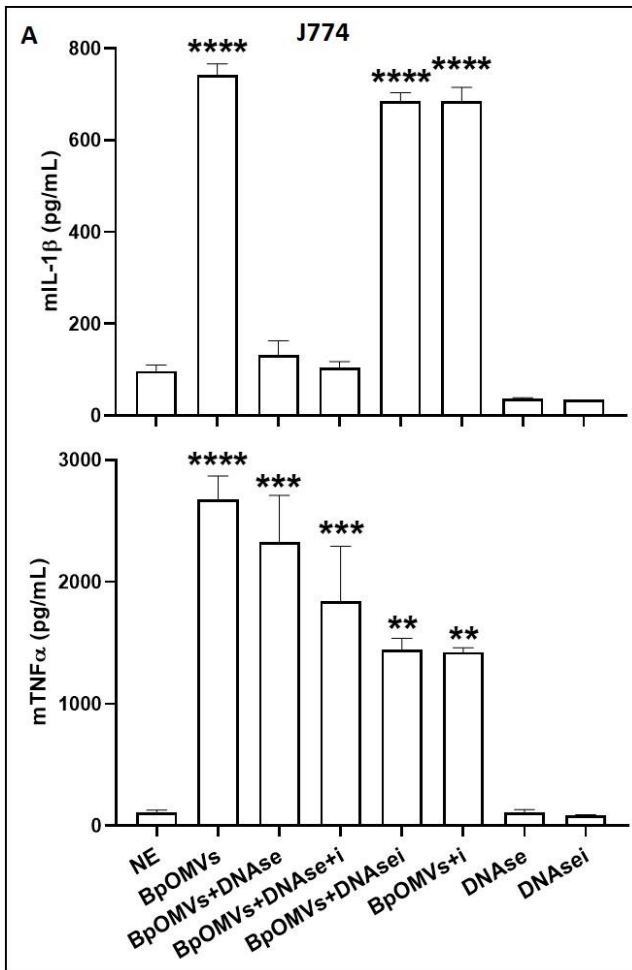


Figura 23A. Las BpOMVs transportan DNA que puede ser sentido por monocitos macrófagos murinos. Medida de mIL-1 β (A, panel superior) y mTNF α (A, panel inferior) en sobrenadante de células J774 estimuladas con BpOMVs digeridas con DNAsa y sus controles. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$).

depende significativamente del mismo, pero no tan drásticamente como es la dependencia con NLRP3, donde la secreción de dicha citoquina es prácticamente nula (Figura 22C). La secreción de la citoquina inflamatoria independiente, mIL-12p40, se mantuvo en niveles equivalentes entre los estímulos y entre las cepas (Figura 22D). Como control, estimulamos las mismas células WT, Aim2^{-/-} y Nlrp3^{-/-} con BpDNA cromosomal tanto libre como transfectado y evidenciamos que únicamente cuando el ADN se dispensa al citosol de la célula, este es capaz de estimular la secreción de cantidades significativas ($p < 0.0001$) de mIL-1 β , de manera dependiente de AIM2 e independiente de NLRP3 (Figura 22E). Por otro lado, los controles no estimulados, FuGENE solo y BpDNA libre, no estimulan la secreción de mIL-1 β . La secreción de mIL-12p40 fue estimulada por BpDNA tanto transfectado como libre (Figura 22F), probablemente debido a la señalización a través de otros sensores de dsDNA como TLR9 y cGAS-STING^{402,403}.

Para corroborar que el tratamiento con DNAsa no afecta otros componentes antigénicos presentes en las BpOMVs, realizamos distintos estímulos controles sobre la línea celular murina J774. La inactivación de la DNAsa consiste en un tratamiento térmico a 75°C durante 10 minutos. Por tanto, un control fue someter a esta T° a las BpOMVs (BpOMVs+i), a las BpOMVs previamente digeridas con DNAsa (BpOMVs+DNase+i) y a la DNAsa antes de digerir las BpOMVs (BpOMVs+DNasei). Los niveles de mIL-1 β se vieron disminuidos en los casos donde la enzima estaba activa (Figura 23A, panel

superior). En el caso en que la enzima fue inactivada previamente a la digestión, no se vio dicho efecto. El tratamiento térmico no afectó la capacidad de las BpOMVs de activar el inflamosoma, y la enzima *per se*, activa (DNase) e inactiva (DNasei) no generó ningún tipo de efecto en las células, al menos en cuanto a secreción de mL-1 β y mTNF α (Figura 23A panel superior e inferior, respectivamente). Todas las condiciones en presencia de BpOMVs estimularon una secreción significativa de mTNF α en comparación con la condición no estimulada ($p < 0,01$, Figura 23A, panel inferior), independientemente del tratamiento enzimático. Para confirmar que en células humanas la vía de AIM2 también está involucrada, utilizamos la línea THP-1 con las mismas condiciones mencionadas para la Figura 23. El patrón de secreción de hIL-1 β fue similar al de mL-1 β generado por las J774 (Figura 23B, panel

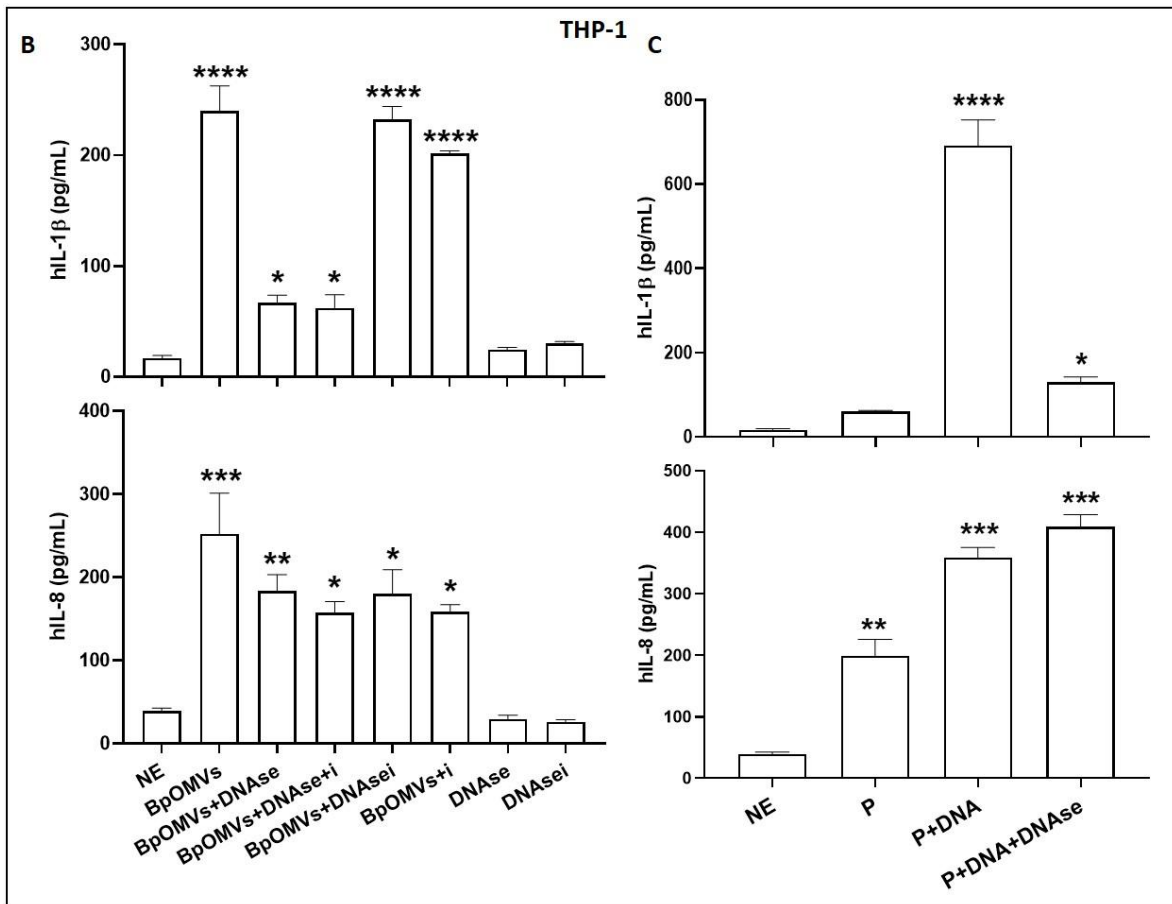


Figura 23B y C. Las BpOMVs transportan DNA que puede ser sentido por monocitos macrófagos humanos. Medida de hIL-1 β (B, panel superior) y hIL-8 (B, panel inferior) en sobrenadante de células THP-1 estimuladas con BpOMVs digeridas con DNase y sus controles. Control de digestión de DNase en THP-1 (C). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ y **** $p \leq 0,0001$).

superior), mientras la secreción de hIL-8 se mantuvo constante (Figura 23B, panel inferior). Confirmamos también que la línea THP-1 responde específicamente a un estímulo de activación del inflamósoma AIM2-dependiente como es *prime* + transfección de pcDNA, y que la misma se ve anulada luego de la previa digestión con DNAsa ($p < 0,05$, Figura 23C, panel superior). El control de medida de hIL-8 se vio invariable entre las condiciones (Figura 23C, panel inferior).

Con estos resultados demostramos que las BpOMVs poseen ADN asociado a las mismas, y éste sería otro de los factores que contribuyen a la activación del inflamósoma además del BpLOS. Por otro lado, AIM2 no es el único PRR que reconoce al ADN doble hebra dentro de una célula hospedadora⁴⁰². Es sabido que la principal consecuencia luego de una acumulación de ADN citosólico es la inducción de un amplio programa transcripcional que incluye los genes que codifican para los interferones de tipo I y a raíz de ellos, otro conjunto de genes estimulados por interferon (ISGs)^{404,405}. La proteína de unión a ADN cGAS, inicia la respuesta seguido de la molécula adaptadora que estimula los genes de interferon (STING), desencadenando la respuesta de interferones de tipo I. Teniendo esto en cuenta y la evidencia de que la inmunización con BpOMVs tanto s.c. como pulmonar induce la expresión de interferones de tipo I luego de 4 hs de la administración de las mismas en el modelo murino⁴⁰⁶, nos propusimos evaluar si las BpOMVs son capaces de inducir esta respuesta en nuestro modelo de estudio. Para ello, usamos una línea celular de melanoma murino B16 reportera SEAP para interferones de tipo I. Esta línea, a través de la actividad de SEAP reporta la señalización a través del receptor de interferones de tipo I (IFNR), incluso el secretado por las mismas células que actúa de manera autócrina/parácrina. Estimulamos estas células con BpOMVs, polyI:C como control positivo y polyI:C digerido con RNAsa como control negativo. Luego de la incubación medimos actividad SEAP en el sobrenadante de cultivo. No detectamos actividad SEAP para el caso de la estimulación con BpOMVs, de manera similar a la condición no estimulada o la estimulada con polyI:C tratado previamente con RNAsa. Por el contrario, la estimulación con polyI:C indujo la secreción de SEAP como era esperado (Figura 24A). Atendiendo la posibilidad que exista una funcionalidad diferencial entre la línea epitelial B16 y las líneas monocíticas macrofágicas, decidimos estimular las células B16 con sobrenadante de cultivo de células J774 estimuladas previamente con BpOMVs. Nuevamente no se observó actividad SEAP en comparación con el estímulo con sobrenadante de cultivo de la línea B16 estimulada previamente con polyI:C (Figura 24B). Como control de que el principio activo en dicho sobrenadante eran los interferones de tipo I y no posibles resabios de polyI:C del estímulo anterior, tratamos con RNAsa el sobrenadante previamente a la estimulación de un cultivo fresco de B16. En este caso, tanto el sobrenadante polyI:C

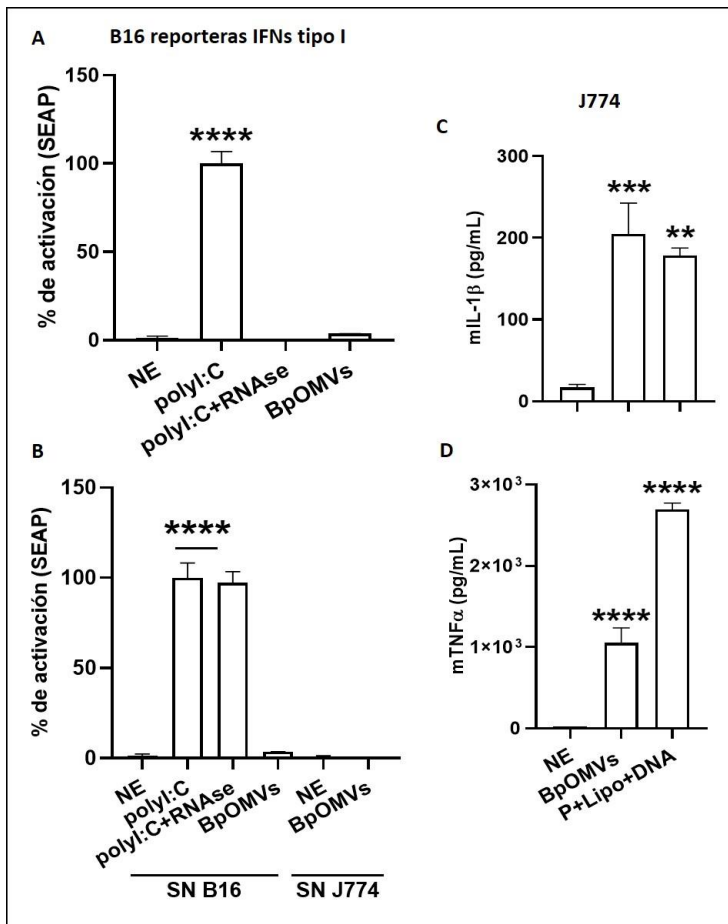


Figura 24A-D. Las BpOMVs no son capaces de estimular una respuesta de IFNs de tipo I. Se estimularon células B16 reporteras SEAP de IFNs de tipo I con BpOMVs y polyI:C como control positivo (A). Se estimularon las mismas células con sobrenadantes de cultivo de B16 y J774 estimuladas previamente con polyI:C y BpOMVs (B). Medida de mL-1β (C) y mL-6 (D) por ELISA en sobrenadante de cultivo de J774 estimuladas con BpOMVs y transfectadas con pcDNA. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$).

mayores al control no estimulado ($p < 0,0001$, Figura 24D). Estos resultados son similares a los observados con BMDM (Figura 22E). No descartamos que estos resultados sean una manifestación de posibles limitaciones de la línea celular o que exista un efecto contraregulatorio entre las respuestas de cGAS-STING y AIM2 frente al sensado de ADN doble hebra intracitosólico ⁴⁰⁷⁻⁴⁰⁹.

digerido previamente con RNAsa como el sin tratar, dieron señales de actividad SEAP similares (Figura 24B). En función de que la respuesta de interferones de tipo I frente a la presencia de ADN citosólico es una respuesta generalizada/canónica por parte de células mieloides, utilizamos la línea J774 para evaluar si es capaz de sensorarlo. Para ello realizamos un *prime* y luego transfectamos con pcDNA, además de estimular con BpOMVs como control. Como ya habíamos observado con anterioridad, las BpOMVs fueron capaces de inducir secreción de mL-1β en células J774 como así también la condición de *prime* más la transfección de pcDNA (Figura 24C). Lo mismo se observa para la secreción de mTNFα donde los estímulos con BpOMVs y la transfección de pcDNA fueron capaces de inducir niveles de citoquina significativamente

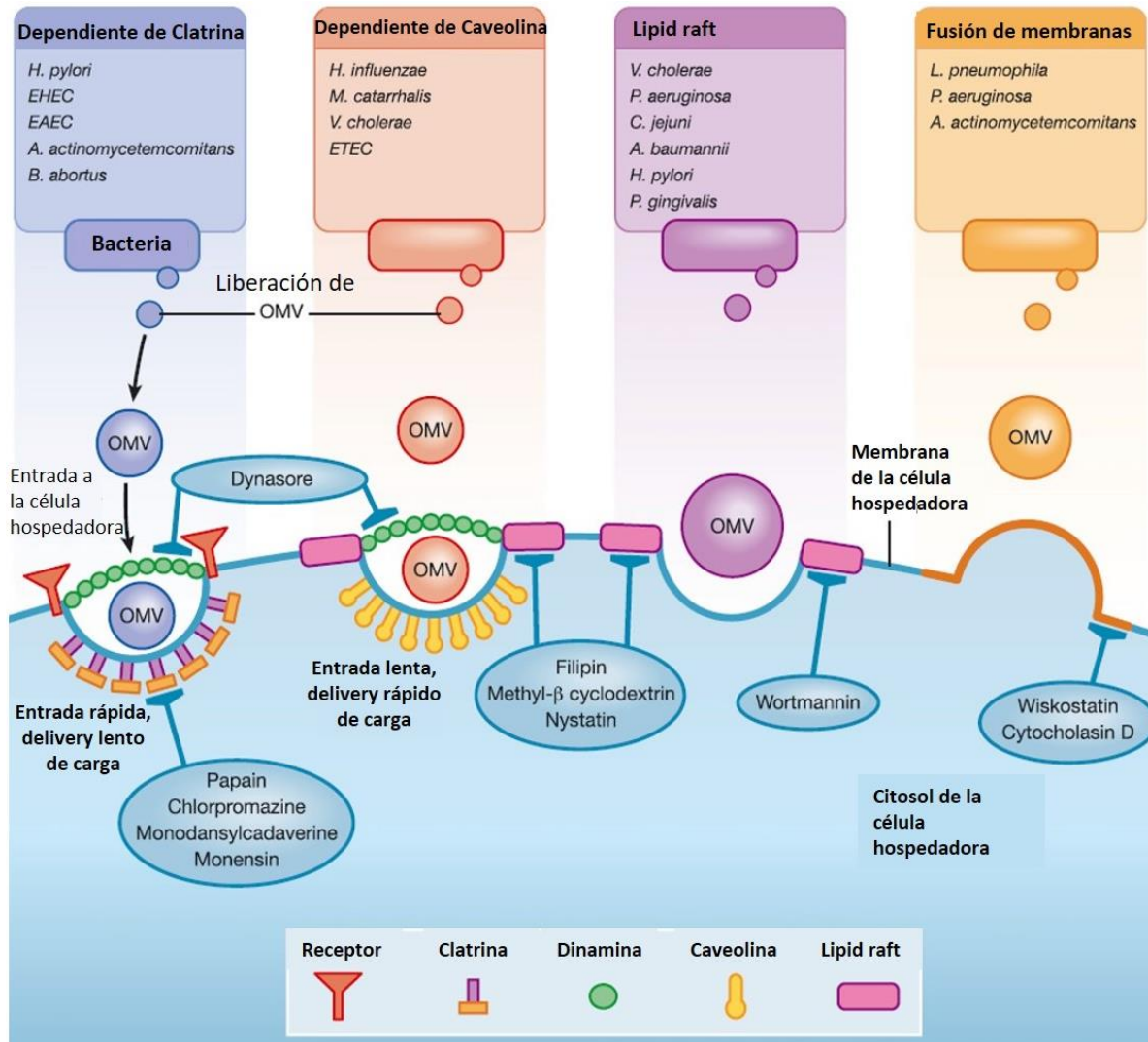
Con estos resultados podemos concluir que las BpOMVs cargan ADN doble hebra, el cual es sentido por AIM2, y junto con el BpLOS, serían algunos de los factores responsables de la activación del inflamosoma por nuestro candidato vacunal.

2.7. Las BpOMVs son internalizadas por macrófagos murinos.

Para que el BpLOS y el ADN asociados a las BpOMVs sean sentidos por Caspasa-11 y AIM2 respectivamente, estos deben acceder al citosol. Distintos mecanismos se han descrito para la internalización de OMVs provenientes de diferentes bacterias ⁴¹⁰.

Para la internalización de OMVs por la célula hospedadora se ha reportado que además del requisito de endocitosis ⁴¹¹⁻⁴¹³ mediado por clatrina ^{414,415} o caveolina ⁴¹⁶, esta puede ser dependiente ^{411,412,417-419} o independiente de *lipid-rafts* ⁴²⁰. Los dos tipos de endocitosis pueden desencadenarse por unión de alguno de los ligandos presentes en las OMVs con algún receptor de superficie ^{421,422}. Por ejemplo, se ha reportado que las OMVs de EHEC entran a la célula de manera dependiente de LPS y clatrina ³⁸⁴ y las OMVs de *Moraxella catarrhalis* ingresarían a las células epiteliales humanas a través de interacciones entre el receptor TLR2, caveolina y *lipid-rafts* ⁴²³. Se han reportado también como mecanismos de entrada de OMVs a la macropinocitosis y la fusión de membranas ^{410,418}. En la Representación 15 se resumen los mecanismos de entrada de OMVs de distintas especies bacterianas a la célula hospedadora.

Para demostrar la internalización de las BpOMVs por BMDM murinos, estimulamos estas células con BpOMVs previamente marcadas con CFSE (más detalles en la sección Materiales y Métodos). Teniendo en cuenta que la endocitosis es un proceso activo ⁴¹¹ que requiere que las células estén metabólicamente activas, incluimos como control negativo la incubación a 4°C. Luego de 5 hs, procedimos a la preparación de las células para realizar análisis por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.



Representación 15. Rutas de entrada de OMVs en células hospedadoras. Varias son las vías descritas que permiten la entrada de OMVs a la célula hospedadora. Estas rutas pueden requerir fosas recubiertas de clatrina, de caveolina, lipid rafts o la fusión directa entre membranas. La entrada de OMVs puede verse afectada por el uso de diversos inhibidores que afectan los componentes de estas vías: clorpromazina: inhibe la formación de la fosa recubierta de clatrina; papaina: degrada proteolíticamente los receptores de proteínas de superficie; monensina, disipa el gradiente de protones; monodansilcadaverina, inhibe la internalización del receptor; dynasore: inhibe la actividad de la dinamina GTPasa; metil-β ciclodextrina, extrae el colesterol de la membrana; filipino y nistatina: intercalan y alteran los dominios de membrana ricos en colesterol; wortmannin: inhibe las fosfatidilinositol quinatas; wiskostatin, inhibe N-WASP, que regula la polimerización de actina; citocolasina-D, despolimeriza la actina. Adaptado de O'Donoghue & Krachler 2016.

Para el análisis por citometría de flujo, las células se marcaron con anticuerpos anti-F4/80-APC y anti-MHCII-PE. La estrategia de análisis de las poblaciones (“gating”) que se presenta en la Figura 25A, consistió en seleccionar primeramente las células mieloides por SSC-A vs. FSC-A, luego las células F4/80+MHCII+ y, por último, dentro de dicha población la intensidad de fluorescencia media verde correspondiente a las BpOMVs-CFSE en ambas condiciones de temperatura. Sorprendentemente, se

observa un corrimiento más marcado de la intensidad de fluorescencia media verde para la condición que se incubó a 4°C (Figura 25B). Este corrimiento corresponde a un mayor porcentaje de células con marca CFSE para esta condición en comparación con la incubación a 37°C (53.4 vs. 20.6% respectivamente) (Figura 25B). Por otro lado, el análisis por microscopía confocal de fluorescencia mostró que en la condición a 4°C la marca verde se encuentra aglutinada por fuera de las células mientras que en la condición a 37°C la misma se encuentra dispersa en el interior de las células (Figura

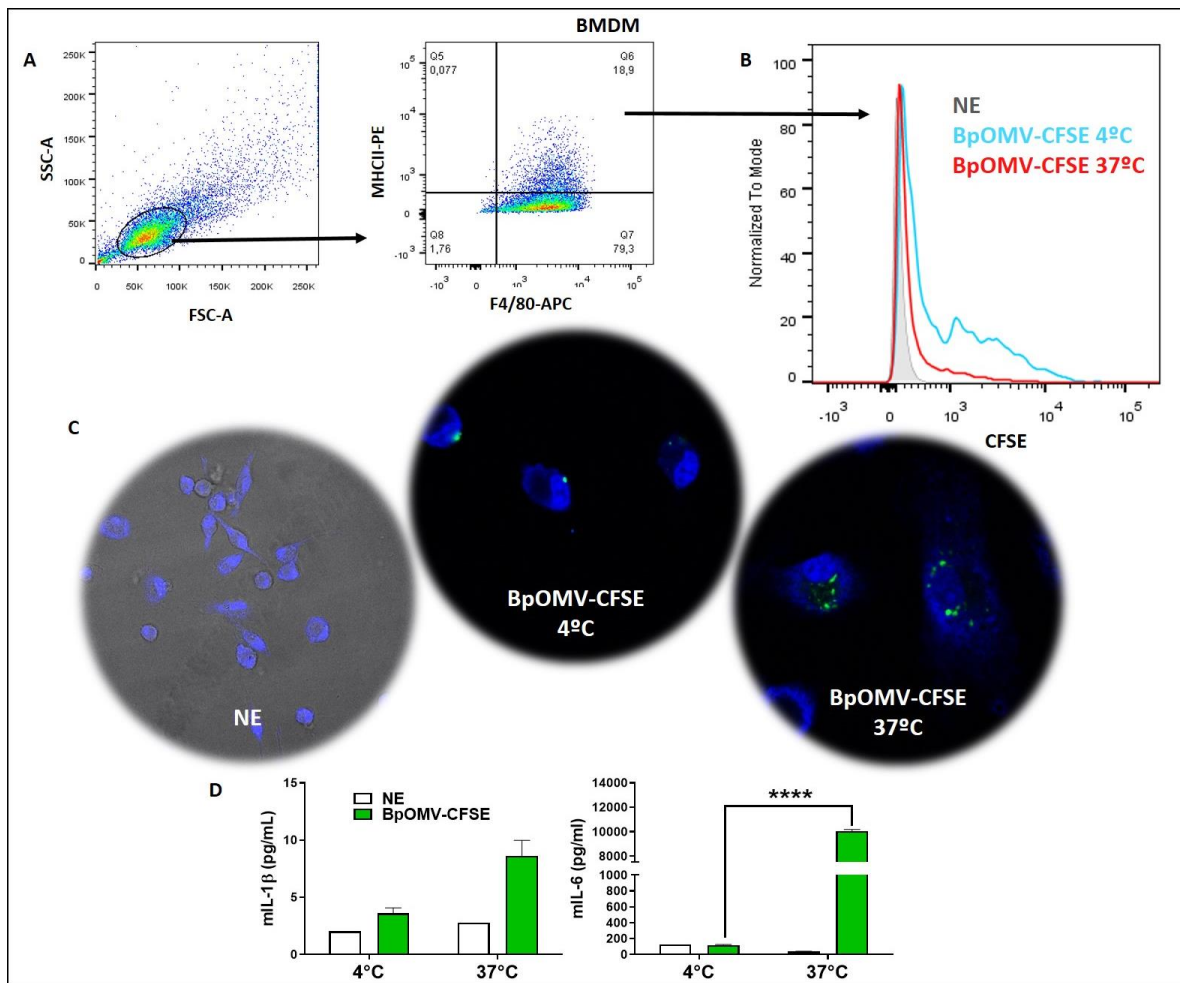


Figura 25. Internalización de BpOMVs por BMDMs. Análisis por citometría de flujo de BMDM estimuladas con BpOMVs-CFSE a 4 y 37°C. Estrategia de gating utilizada (A). Histograma que muestra porcentaje de células con fluorescencia CFSE en las distintas condiciones estudiadas (B). Microscopía confocal de las condiciones correspondientes a B (C). Medida de mIL-1β y mIL-6 por ELISA en sobrenadante de cultivo de BMDM de las condiciones estudiadas (D). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente según indica la barra (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$).

25C). Los controles no estimulados tanto a 4°C como a 37°C no presentaron marca verde (como ejemplo se muestra la condición NE a 4°C).

Para corroborar, además, que efectivamente a 4°C las células están inactivas metabólicamente, medimos citoquinas mL-1 β y mL-6 en los sobrenadantes de cultivo de las células. Para el caso de mL-1 β , no se observó una diferencia significativa entre las dos temperaturas ensayadas, pero sí una tendencia a una mayor secreción en la condición estimulada con BpOMVs-CFSE a 37°C (Figura 25D, panel izquierdo). En cambio, la secreción de mL-6 fue significativamente mayor para la condición estimulada con BpOMVs-CFSE a 37°C en comparación con la condición a 4°C ($p < 0,0001$, Figura 25D, panel derecho). Con estos resultados podemos inferir que la mayor marca de fluorescencia verde observada por citometría de flujo a 4°C no se debe a una verdadera internalización de BpOMVs-CFSE, sino a una aglutinación/asociación de las vesículas sobre la superficie de las células, no siendo evidente el proceso de internalización.

En vistas de seguir profundizando el estudio del mecanismo de internalización de BpOMVs, estimulamos la línea monocítica/macrofágica murina J774 con BpOMVs a 37°C durante 5 hs en presencia de un inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina, la Citalasina-D (Cito-D). La estrategia de estimulación sobre las células consistió en un *prime* de EclPS durante 1 hora y BpOMVs marcadas con CFSE. De este modo, podemos evaluar si una activación (*prime*) previa modifica la internalización de las mismas. Las células se prepararon para las determinaciones por citometría de flujo y microscopía como se detalla en la sección “Materiales y Métodos, Capítulo 2”. La estrategia de *gating* mostrada en la Figura 26A, consistió en seleccionar primeramente las células mieloides por SSC-A vs. FSC-A, luego las células vivas por LIVE/DEAD-, y por último la población mioide F4/80+. En dicha población hubo emisiones de fluorescencia verde correspondiente a las BpOMVs-CFSE. De acuerdo al porcentaje de células se observa que la internalización sería mayor para las condiciones de tratamiento con Cito-D y de *prime* + BpOMVs-CFSE (33,0% para BpOMVs, 38,6% para BpOMVs + CitoD y 40,8% para P + BpOMVs). Si analizamos los cambios en el parámetro de intensidad de fluorescencia media (Figura 26B), podemos observar que hay un leve corrimiento para la condición *prime* + BpOMVs-CFSE en comparación a las otras dos condiciones evaluadas.

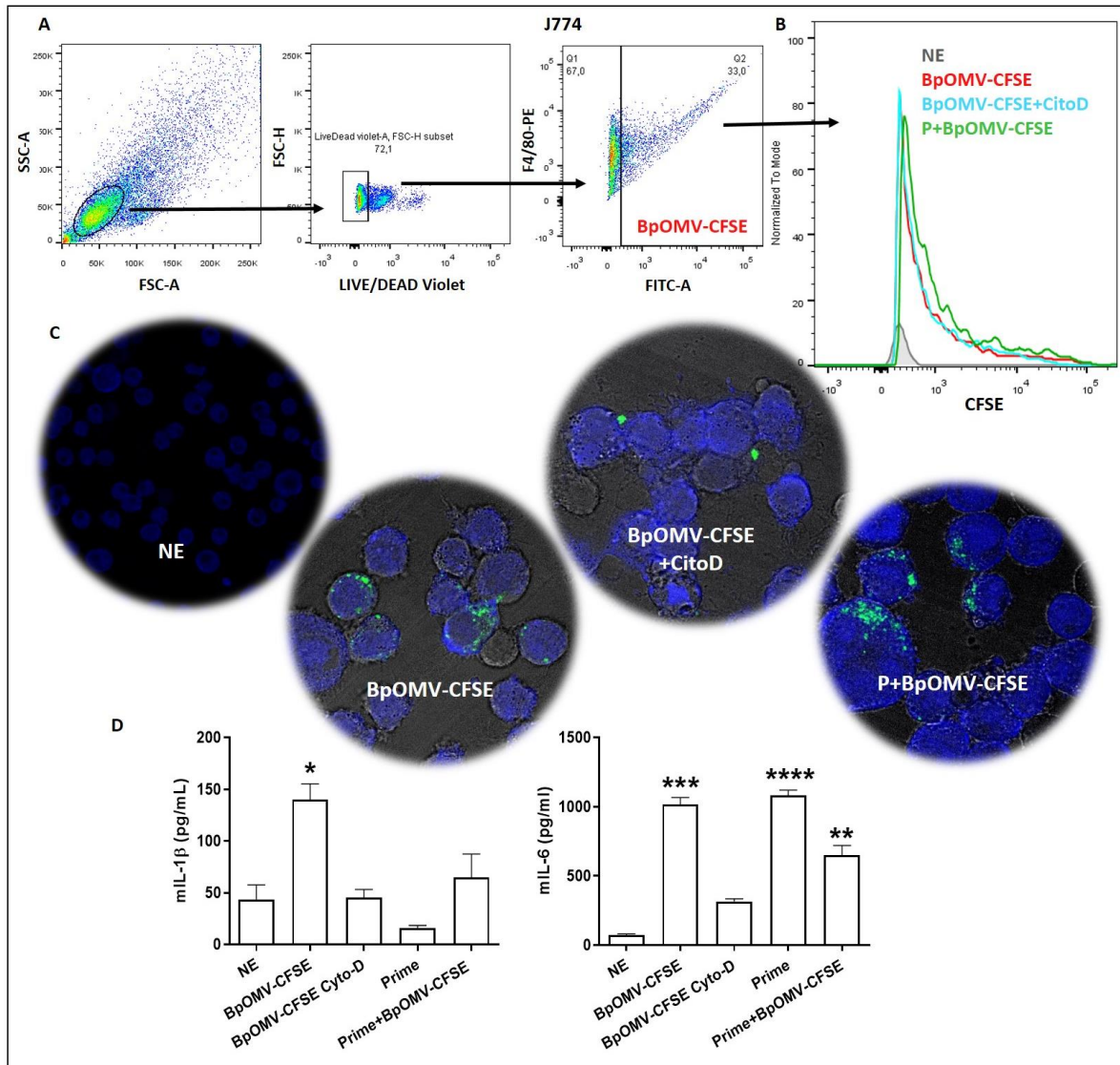


Figura 26A-D. Internalización de BpOMVs por células J774. Análisis por citometría de flujo de células J774 estimuladas con BpOMVs-CFSE. Estrategia de gating utilizada (A), histograma de intensidad de fluorescencia verde CFSE para las condiciones no estimulada (NE), BpOMVs-CFSE, BpOMVs-CFSE+CitoD y Prime+BpOMVs-CFSE (B). Microscopía confocal de las condiciones correspondientes a B (C). Medida de mIL-1 β y mIL-6 por ELISA en sobrenadante de cultivo de células J774 de las condiciones mostradas en C (D). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$).

Por otro lado, se observa por microscopía que de manera similar a la incubación a 4^oC, la marca fluorescente verde correspondiente a la condición BpOMVs-CFSE + Cito-D se encuentra aglutinada/concentrada por fuera de las células. Las condiciones estimuladas con BpOMVs y P + BpOMVs mostraron marca verde en el interior de las mismas. En la condición NE no se observa

fluorescencia verde (Figura 26C). Medimos nuevamente citoquinas en sobrenadante de cultivo y para el caso de $\text{mIL-1}\beta$ la estimulación con BpOMVs generó una secreción significativamente mayor en comparación a las condiciones NE y tratadas con BpOMVs + CitoD. Para el caso de P + BpOMVs se observó una mayor secreción de $\text{mIL-1}\beta$, pero la misma no llegó a ser significativamente diferente (Figura 26D, panel izquierdo). La secreción de mIL-6 fue significativamente mayor para las condiciones de BpOMVs, *prime* y *prime* + BpOMVs en comparación con las condiciones NE y en presencia de BpOMVs + CitoD (Figura 26D, panel derecho). Estos resultados nos indican nuevamente que por citometría de flujo no es posible discernir si la marca de las OMVs es intra o extracelular. Las condiciones de incubación de BpOMVs a 4°C y con el inhibidor Cito-D, si bien mostraron una mayor intensidad de fluorescencia/porcentaje de células CFSE+ por citometría, la misma no fue indicativa de una localización intracelular de las vesículas, hecho que pudo evidenciarse por microscopía. La no internalización de BpOMVs quedó también evidenciada porque en esas condiciones no se estimula la secreción de citoquinas pro-inflamatorias $\text{mIL-1}\beta$ y mIL-6 .

Por último, sobre las células J774 estimuladas con BpOMVs-CFSE utilizamos como marcador de endosomas tempranos un anticuerpo anti-LAMP1-PE. En estos experimentos marcamos los núcleos de las células con yoduro de propidio (IP). Como se muestra en las fotos de la Figura 26E, a través de estos

E

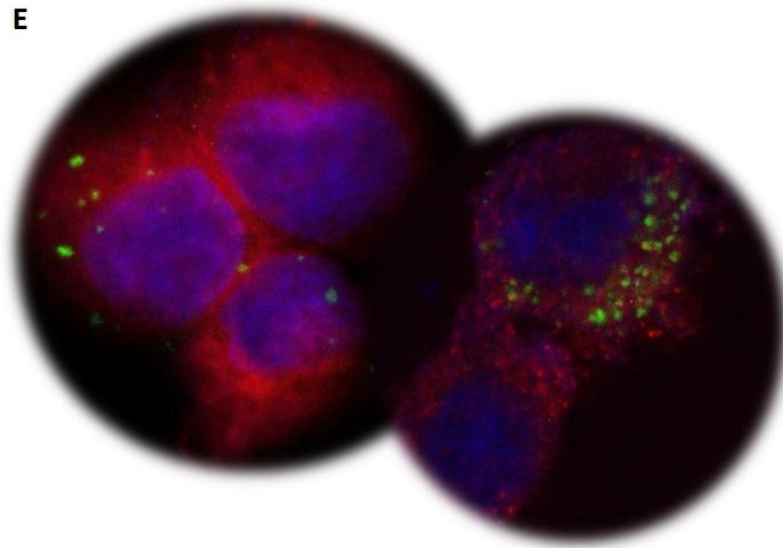


Figura 26E. Las BpOMVs no colocalizan con el marcador de endosomas tempranos LAMP-1. Microscopía confocal de células J774 estimuladas con BpOMVs-CFSE (verde) durante 5 hs y marcadas con anticuerpo anti-LAMP-1-PE (rojo). Los núcleos se marcaron con IP (azul).

ensayos de marcación, no pudimos evidenciar la colocalización de las marcas verde y roja indicando que al menos, al tiempo estudiado (5 hs), las BpOMVs no se encuentran en los endosomas tempranos.

Estos resultados preliminares marcan la necesidad de continuar los trabajos en esta temática en un futuro próximo.

Discusión

En este Capítulo pudimos demostrar que las BpOMVs poseen la capacidad de activar la vía innata del inflamósoma induciendo la secreción de IL-1 β y/o IL-18 a través de distintos factores de la célula hospedadora como NLRP3, AIM2, Caspasa-1, Caspasa-11 y GSDMD. Esta información resumida en este primer párrafo es novel para *B. pertussis* y novel para nuestro candidato vacunal. La robustez de los resultados alcanzados no solo recae en la diversidad de abordajes realizados a lo largo de este Capítulo de tesis sino también en el empleo de distintas líneas celulares mieloides tanto murinas como humanas que permitieron mostrar la amplitud del rol de las BpOMVs en la activación del inflamósoma. La secreción de IL-1 β es una señal inequívoca de la activación del inflamósoma y en este trabajo, la detección de IL-1 β por las técnicas de inmunoblotting y ELISA confirmaron la presencia de IL-1 β madura en sobrenadantes de cultivo después del tratamiento con BpOMVs.

La activación del inflamósoma que lleva al aumento de la secreción de interleuquinas pro-inflamatorias se describe como un procedimiento en dos pasos: primero, debe haber un *prime*, y luego, una segunda señal induce la activación y ensamblado del SMOC ⁴²⁴. Aquí pudimos demostrar que nuestro candidato vacunal funciona tanto como señal 1 y como señal 2 del inflamósoma. Respecto de su actividad como señal 1 demostramos que la misma es dependiente del adaptador Myd88 que sabemos está implicado en la señalización ulterior de los TLRs ^{425,426}. Observamos además que el aumento en la secreción de la citoquina IL-1 β y/o IL-18 ocurre incluso en ausencia de EclPS como *prime*, probablemente como consecuencia de la variedad antigénica que presentan las BpOMVs ²⁷⁹. Dentro de dicha diversidad antigénica identificamos al BpLOS y al ADN como actores clave en la activación del inflamósoma. Pudimos también observar que la inducción de la secreción de la citoquina IL-1 β por las BpOMVs depende parcialmente del flujo de iones K⁺, una de las señales canónicas de activación de NLRP3. En lo que refiere a la activación no canónica del inflamósoma por el BpLOS y Caspasa-11 corroboramos, como ocurre en otros casos ³⁹⁶, que la misma es dependiente del grado de acilación del LOS. Observamos además que el BpLOS transfectado al igual que lo hacen las BpOMVs, induce la expresión de GBP1, GBP2, GBP3, GBP5 y GBP7, mostrando una implicancia de estas proteínas en la activación del inflamósoma.

Nos parece interesante destacar que el reconocimiento del BpLOS tanto libre como intracitosólico resultó ser diferencial entre los macrófagos murinos y los humanos. La diferencia detectada en la secreción de hIL-1 β por parte de las THP-1 transfectadas con BpLOS en comparación a

la contraparte murina BMDM, podría explicarse en base a las diferentes especificidades que tienen Caspasa-11 y sus ortólogas humanas Caspasa-4/5. Estas especificidades dependen, entre otros factores, del nivel de acilación del LPS/LOS: mientras Caspasa-11 reconoce LPS hexa y pentaacilado, Caspasa-4 reconoce LPS hexa y tetraacilado ^{396,427}. Esto también daría sustento a la observación de la disminución significativa de mL-1 β observada en BMDMs murinos estimulado con BpOMVs que poseen BpLOS tetraacilado proveniente de la cepa mutante de *B. pertussis* que expresa la enzima deacilasa PagL. Respecto de la otra diferencia entre el modelo murino y el humano por nosotros detectada, la secreción de citoquinas dependientes del factor de transcripción Nf- κ B, existe bibliografía sobre las diferencias interespecie del receptor y co-receptor de LPS TLR4/MD-2. Adicionalmente, es conocido la amplia variedad de moléculas que pueden activar TLR4 además del LPS, como, por ejemplo, la PT de *B. pertussis* también presente en las BpOMVs ^{279,391}. Como consecuencia de la propia evolución, existe una variedad sustancial de afinidades y especificidades de TLR4 por sus ligandos, en los patrones de expresión celulares del gen *Tlr4* y en la distribución tisular de los mismos ⁴²⁸. Las diferencias en especificidad parecen recaer en las divergencias en la cadena aminoacídica tanto de la molécula de TLR4 como de MD-2. Resultados obtenidos en líneas celulares humanas THP-1/HEK muestran que el TLR4 presente en esas líneas y no en líneas murinas, tal como la línea RAW264.7, es capaz de activarse diferencialmente frente al LPS hexa- y penta-acilado producido por *Pseudomonas aeruginosa*, reconociendo hexa- pero no el penta-acilado ⁴²⁹. Esta discriminación es mediada por la región de TLR4 hipervariable de 82 aminoácidos ⁴²⁹. En línea con estos hallazgos, encontramos que las células THP-1 estimuladas con BpLOS pentaacilado no inducen la secreción de hIL-8, mientras sí lo hace en respuesta a EcLPS hexaacilado. En esta línea THP-1, donde demostramos que las BpOMVs pueden ser señal 1 y 2 del inflamosoma, la PT podría ser una de las moléculas responsable de la señal 1.

Varios estudios han demostrado la capacidad de OMVs de distintas especies de dispensar LPS en el citosol de células hospedadoras y de activar el sensor intracitosólico de LPS, Caspasa-11, por ejemplo, OMVs de EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) ³⁸⁴. Previamente, nuestro grupo había descrito que el BpLOS contenido en las BpOMVs influye en su actividad biológica ²⁷⁷. Aquí, hemos podido demostrar que el BpLOS una vez en el interior de las células es detectado por Caspasa-11 y que así, las BpOMVs desencadenan la activación no canónica del inflamosoma. Un posible mediador de la lisis de vacuolas o vesículas endocíticas que contienen patógenos u OMVs son las GBPs que promueven la liberación del LPS/LOS en el citosol, y facilitan la interacción de dichas moléculas con la Caspasa-11 ³⁸³. Demostramos que la expresión de GBPs aumenta después de la estimulación con BpOMVs y BpLOS

transfectado, y que células deficientes en varios genes de GBPs (GBPchr3^{-/-}) son incapaces de inducir secreción de IL-1 β luego de la estimulación con BpOMVs. La expresión de GBPs depende de la señalización de interferones³⁸⁹. Si bien no pudimos demostrar la capacidad de las BpOMVs de estimular la secreción de IFNs de tipo I en la línea celular B16 reportera SEAP de estos IFNs, otros investigadores han demostrado que la inoculación intranasal de BpOMVs es capaz de estimular esta vía⁴³⁰. Por otro lado, estudios recientes proponen que las GBPs isopreniladas pueden asociarse a la superficie de OMVs o con el LPS citosólico y que el factor que determina el reclutamiento de GBPs es el propio LPS³⁸³. Esos hallazgos y nuestros propios resultados respaldan el mecanismo en que las GBPs podrían estar interactuando con la superficie de las BpOMVs y así tener un rol en la detección intracelular del BpLOS.

La activación del inflamosoma por parte de las BpOMVs también pudo ser confirmada a través de la visualización de la formación de *specks* fluorescentes de ASC-GFP en una línea humana de monocitos macrófagos. La formación de *specks* representan un sello distintivo del ensamblado canónico del inflamosoma³³⁸.

Otro componente de las BpOMVs que identificamos partícipe en la activación del inflamosoma es el ADN que es sentido por AIM2 (ausente en melanoma 2). Los resultados hallados permitieron poner en evidencia un segundo mecanismo de activación desencadenado por nuestro candidato vacunal. Estos resultados coinciden con reportes que indican que OMVs de diferentes bacterias Gram-negativas pueden transportar ADN bacteriano al citosol del hospedador y activar la misma vía^{381,431}. AIM2 es un sensor intracelular de ADN doble hebra que junto con ASC, forma un complejo supramolecular que activa a Caspasa-1 y media la liberación de citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18^{333,432}. También se ha reportado la relevancia de las GBPs en la detección del ADN por AIM2 durante la infección⁴³³. Por ejemplo, en un modelo de *Francisella*, las GBPs, específicamente GBP2 y GBP5, se reclutan en la superficie de la bacteria citosólica e IRGB10 es atraída hacia la misma, resultando en la interrupción de la integridad bacteriana y la liberación de ADN, que se vuelve accesible para el reconocimiento por sensores de ADN citosólico^{368,369}. Nos queda pendiente evaluar si las GBPs inducidas por la estimulación con BpOMVs están involucradas en el licenciamiento del acceso del BpLOS y el ADN doble hebra a sus respectivos receptores, Caspasa-11 y AIM2. No podemos descartar que otros factores de virulencia/antígenos de *B. pertussis* presentes en las BpOMVs sean también responsables o aporten a la señalización innata del inflamosoma, como por ejemplo PT que señala vía TLR4 y contribuye a sostener mecanismos proinflamatorios^{186,391} o ACT con su capacidad de formación de poro⁹³, entre otros. Estos ensayos quedan planteados para un futuro cercano.

En este punto nos parece importante destacar que las citoquinas inflamatorias independientes como las que hemos medido en carácter de control, IL-12, IL-6, también orquestan y perfilan la respuesta inmune adaptativa hacia Th1, Th17 y de memoria ^{434,435}, perfiles deseables en el montaje de una respuesta inmune protectora por vacunación contra pertussis. La fracción p40 de IL-12, que en este Capítulo hemos medido por ELISA en sobrenadante de cultivo, es compartida por la IL-12p70 (completa) (IL-12p40+IL-12p35) y por IL-23 (IL-12p40+IL-23p19). Se sabe que IL-23 perfila los linfocitos T naive hacia un perfil Th17 y que la IL-12 lo hace hacia Th1 ⁴³⁶.

Si bien es preciso realizar más ensayos para profundizar en los mecanismos de entrada de las BpOMVs en células monocito macrofágicas, por primera vez hemos evidenciado que efectivamente son internalizadas por BMDM y por la línea celular J774 de manera activa, ya que tanto el tratamiento con Cito-D como la incubación a 4°C afectó la internalización de las vesículas. La Cito-D es un inhibidor de la polimerización y elongación de los filamentos de actina, procesos indispensables para numerosos procesos celulares, por lo que es una droga inespecífica a la hora de querer atribuir un mecanismo de internalización luego de observar una dependencia con la misma. Tanto la macropinocitosis como el tráfico endosomal también dependen de la remodelación de filamentos de actina ⁴¹⁰. Muchas son las preguntas por responder respecto a este tema que seguramente podrán retomar y continuarse en un futuro venidero.

CAPÍTULO 3

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-BpOMVs

“A wonderful fact to reflect upon, that every human creature is constituted to be that profound secret and mystery to every other”

Charles Dickens

Introducción

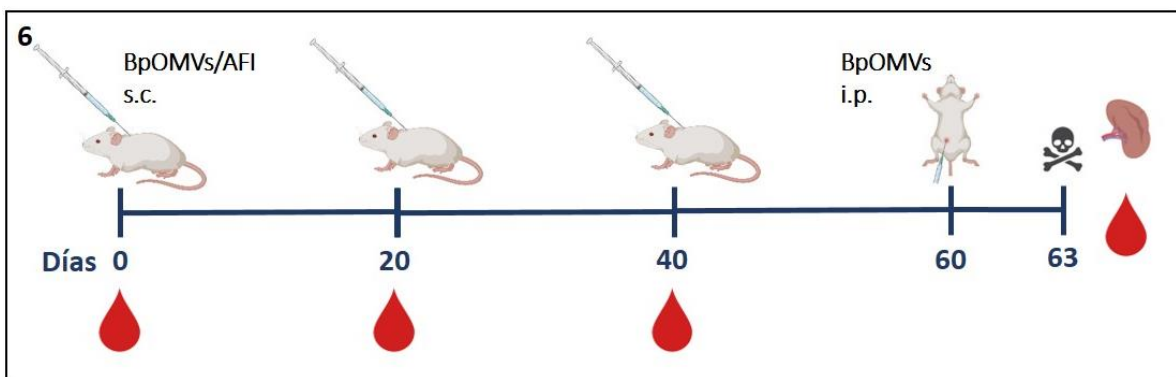
Hoy en día, los anticuerpos monoclonales se utilizan en una amplia gama de tratamientos, y sistemas diagnósticos, por ejemplo, como herramientas terapéuticas se utilizan en trastornos autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas, cáncer, trastornos inflamatorios, entre otras problemáticas de salud ⁴³⁷⁻⁴⁴⁰. Desde su descubrimiento, los anticuerpos monoclonales son también esenciales en la investigación básica y aplicada, como parte de una gran variedad de técnicas tales como la inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, inmunoblotting, ELISA, citometría de flujo, entre otras. El uso de esta herramienta en la investigación científica ya ha permitido ampliar la comprensión de una variedad de enfermedades y procesos biológicos, ha permitido la identificación de marcadores de superficie celular ⁴⁴¹, y se han podido desarrollar numerosos ensayos de detección, técnicas de purificación e identificación de genes ⁴⁴².

La genialidad del descubrimiento del científico argentino César Milstein, laureado con el premio Nobel y quien no patentó su descubrimiento ⁴⁴³, fue encontrar una manera sencilla y rápida de producir células inmortales capaces de fabricar anticuerpos contra un antígeno particular. La técnica propuesta por Milstein consiste, básicamente, en fusionar el linfocito B productor de anticuerpos, proveniente del bazo del animal inmunizado con el antígeno de interés, con una célula capaz de dividirse de manera continua *in vitro* y de producir el anticuerpo expresado por el linfocito. Las células inmortales son células de mieloma (células tumorales de estirpe B) que se dividen permanentemente y que no producen ni secretan anticuerpos. Esta línea celular de mieloma carece del gen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HGPRT), por lo que luego de realizarse la fusión, debe cultivarse en el medio selectivo que contiene hipoxantina-aminopterin-timidina (medio HAT). En este medio solo los hibridomas (linfocitos B primarios y las células de mieloma fusionados) sobreviven a medida que han heredado la inmortalidad de las células de mieloma y la resistencia selectiva de los linfocitos B primarios ⁴⁴⁴. Metodológicamente el ensayo es muy simple (ver Materiales y Métodos sección Capítulo 3) ⁴⁴⁵. Estos hibridomas productores de anticuerpos hacen que los mismos sean homogéneos, en cuanto son una única especie molecular que se mantienen igual en el tiempo, reconocen un solo un epítopo (especificidad única) y puede producirse indefinidamente ⁴⁴⁶.

En vista de las múltiples virtudes que presentan los anticuerpos monoclonales para el estudio de mecanismos biológicos de interacción huésped-hospedador, la estandarización de producción de biológicos, la purificación de proteínas, entre otros, nos propusimos desarrollar herramientas que nos permitan consolidar el campo de estudio de la biología de pertussis y la caracterización y estandarización de producción de OMVs. Por eso a continuación detallamos la generación de anticuerpos monoclonales anti-BpOMVs que fueron puestos a disposición como herramientas para diferentes campos de aplicación.

3.1. Generación y caracterización de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-BpOMVs.

Para generar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-BpOMVs realizamos inmunizaciones en ratones BALB/c por vía subcutánea (s.c.) con al menos 3 dosis de 20 µg de BpOMVs formuladas con adyuvante de Freund Incompleto (AFI) espaciadas por 20 días (Esquema 6). Luego de



Esquema 6. Esquema de inmunización con BpOMVs por vía s.c. para producción de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales. Al momento del sacrificio se diseccionan bazo para proceder a la fusión del mismo con células NS0 y se toma muestra de sangre para uso como control positivo a lo largo de los ensayos de screening y caracterización.

la tercera dosis titulamos anticuerpos séricos IgG totales anti-HKBp para seleccionar, de acuerdo al título, el orden de fusiones de bazo (Figura 27). El resto de los ratones siguió el esquema de inmunización cada veinte días con la misma dosis antes mencionada.

En el Esquema 7 se muestra de manera resumida el procedimiento realizado. Sobre los animales seleccionados se procedió

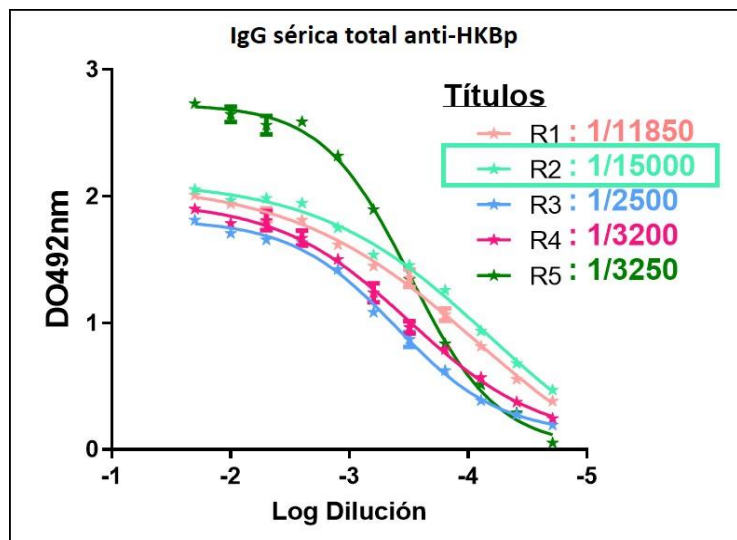
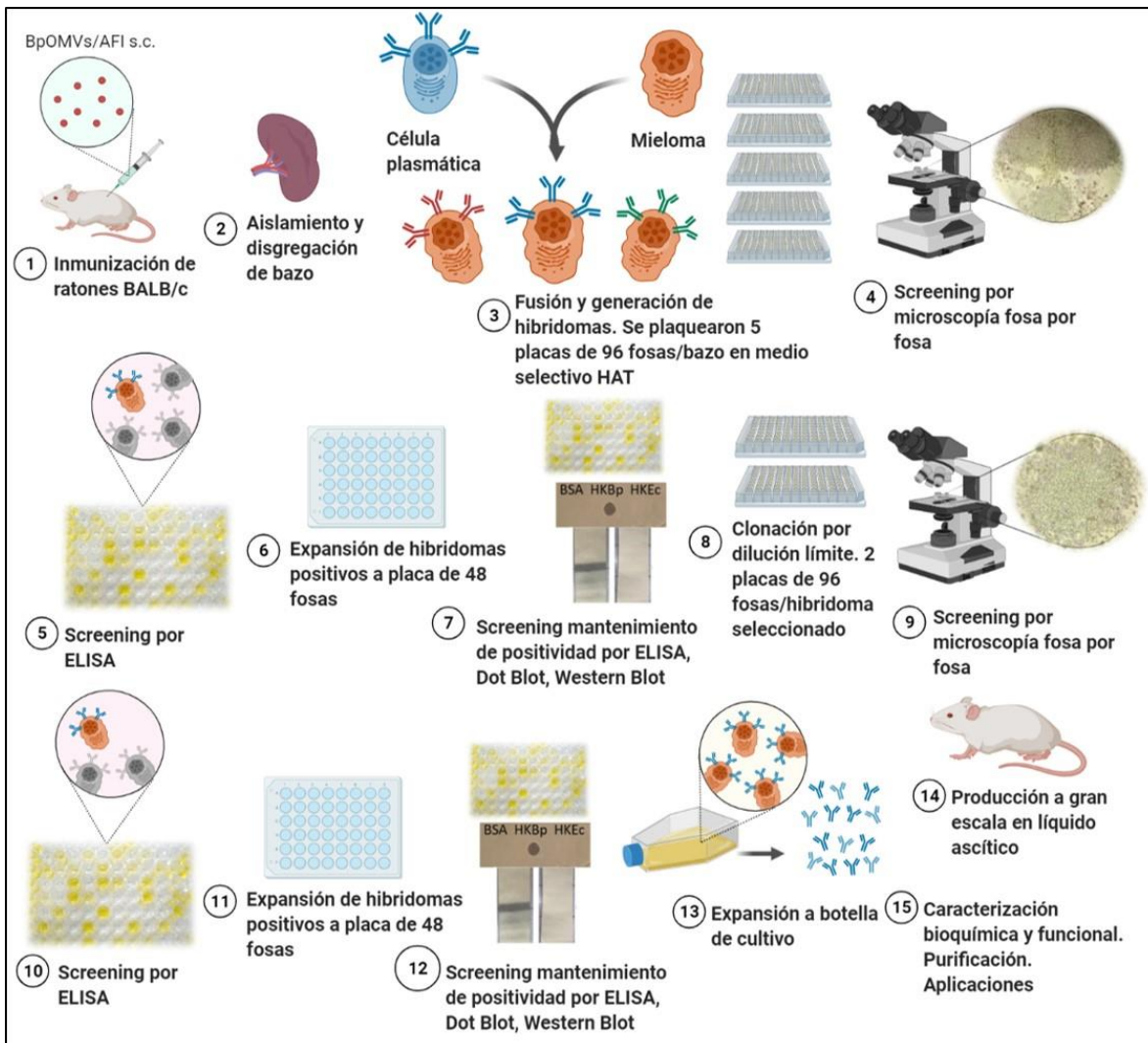


Figura 27. Titulación de anticuerpos séricos IgG totales anti-HKBp de ratones BALB/c inmunizados con BpOMVs para determinar prioridad en proceder a la fusión de bazo.

a realizar un refuerzo (*boost*) con 20 μg de BpOMVs en PBS 3 días antes del sacrificio. De estos animales se disecaron los bazo y con los esplenocitos se procedió a fusionar los mismos con células NSO usando PEG (polietilenglicol) (para más detalles ver sección “Capítulo 3” de Materiales y Métodos) ⁴⁴⁵. Luego se plaquearon las células en cinco placas de 96 fosas con medio selectivo HAT y después de 14 días se realizó el *screening* por microscopía. Este *screening* consta de la observación de las placas fosa por fosa para detectar la presencia de células en reproducción. Los sobrenadantes de cultivo de las fosas que presentaron crecimiento de células se analizaron por ELISA indirecto para determinar los niveles IgG total anti-HKBP. Seleccionamos 2 hibridomas denominados arbitrariamente 24G12 y 52F9 cuyos



Esquema 7. Proceso de generación, selección, expansión, clonación y producción a gran escala de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.

sobrenadantes presentaron una $DO \geq 1$ (punto de corte pre-establecido y de criterio interno) (Figura 28A).

A través de ensayos de Dot Blot detectamos que uno de los sobrenadantes presentó reactividad contra *B. pertussis* (HKBp) y *E. coli* (HKEc) muertas por calor (24G12) y el otro reaccionó sólo contra HKBp (52F2) (Figura 28B). Procedimos luego a evaluar el isotipo IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3 por la técnica de ELISA. Detectamos así que el hibridoma 24G12 secreta anticuerpos IgG2a y el 52F2 secreta IgG1. A través de ensayos de inmunoblotting pudimos observar que la mayoría de los sobrenadantes de los hibridomas generados reaccionaba contra una proteína del lisado de *B. pertussis*/*E. coli* de 63kDa (Figura 28C). Los dos hibridomas se clonaron por dilución límite y aquellas fosas que mantuvieron las características de reactividad por ELISA y Dot Blot/inmunoblotting fueron expandidas. Se obtuvieron así los clones que denominamos 24G12H8 y 52F2B9. Empleando proteínas de *B. pertussis* recombinantes pudimos detectar que los sobrenadantes de cultivo de los clones reconocen a la chaperona GroEL (rGroEL) de 63kDa (la Figura 28D muestra el caso para el clon 24G12H8).

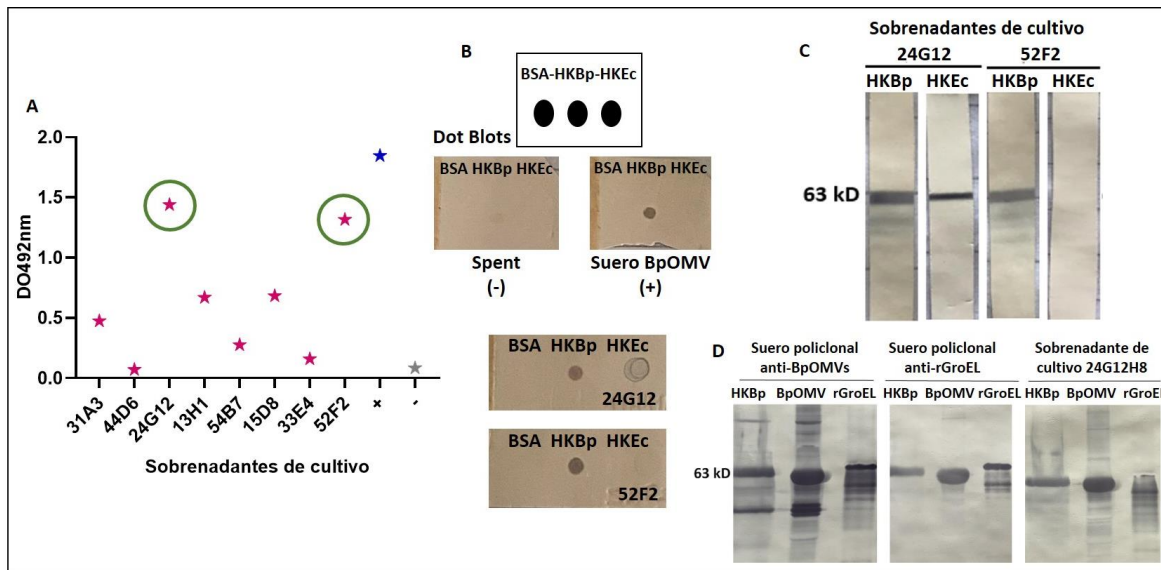


Figura 28. Screening de los sobrenadantes de cultivo de las fosas que presentaron cúmulos de células en crecimiento por observación al microscopio. ELISA indirecto IgG total anti-HKBp de los sobrenadantes de las distintas fosas de cultivo. Se estableció como punto de corte arbitrario de positividad una $DO \geq 1$. Se usó suero del ratón del cual se fusionó el bazo como control positivo y sobrenadante de las células de mieloma NS0 (spent) como control negativo (A). Dot Blots de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas 24G12 y 52F2 contra BSA, HKBp y HKEc (B). Western Blot de los mismos sobrenadantes contra HKBp y HKEc (C). Western Blot del sobrenadante de cultivo del clon 24G12H8 contra HKBp, BpOMV y proteína GroEL recombinante (rGroEL); se usaron sueros policlonales de ratones inmunizados con BpOMV y rGroEL como controles positivos (D).

La chaperona GroEL es una de las proteínas más conservadas entre los organismos vivos. La chaperonina 60 (Cpn60) o GroEL de *E. coli* es la más estudiada y se ha reportado que es una proteína esencial porque junto con la chaperonina 10 (Cpn10 o GroES) forman una máquina de plegamiento de proteínas necesaria para el correcto plegamiento de muchas proteínas y para el reciclaje de las proteínas mal plegadas ⁴⁴⁷.

Una vez obtenidos y caracterizados estos clones, procedimos a generar líquido ascítico a fin de escalar la producción de los anticuerpos. Brevemente, el procedimiento consistió en inocular a 10 ratones BALB/c con Pristane® y una semana después, realizamos la inoculación de $\approx 1 \times 10^6$ células de cada clon (5 ratones/clon). Posterior a ello, realizamos monitoreos diarios de los ratones de forma de evaluar el aumento del volumen en la zona abdominal hasta determinar el momento de realizar la punción peritoneal para colectar el líquido ascítico. Desde el momento de la primera punción y hasta el punto final, los ratones se inocularon s.c. con el analgésico Tramadol diariamente. La producción de ascitis de cada clon proveniente de diferentes animales se colectó en un mismo *pool* y se prosiguió a caracterizarlas mediante corridas en geles SDS-PAGE (Figura 29A). A través de estas corridas

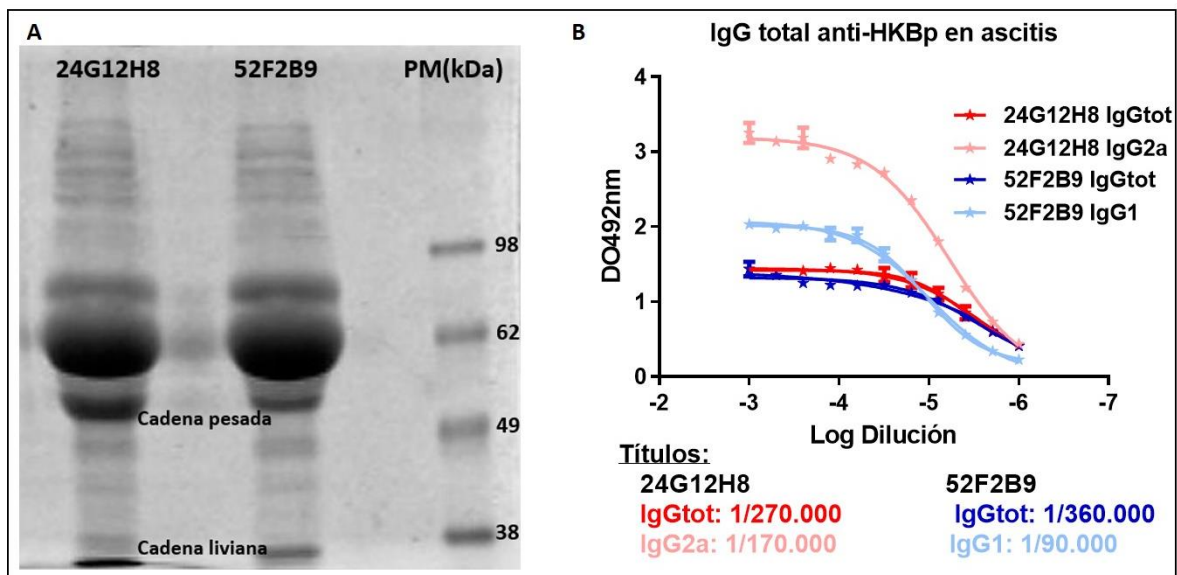


Figura 29. Producción de anticuerpos monoclonales anti-GroEL en líquido ascítico en ratones BALB/c. Gel SDS-PAGE 10% bis/acrilamida teñido con Coomassie Blue de las ascitis de los clones 24G12H8 y 52F2B9 colectadas (A). Titulación de anticuerpos IgG total e isotipo específicos anti-HKBp de las ascitis colectadas (B).

	24G12H8	52F2B9
Columna	HiTrap rProtein A FF, 5 mL.	
Buffer binding	Na ₂ HPO ₄ 20 mM, pH 8. Flujo: 5 mL/min.	Na ₂ HPO ₄ 20 mM + 3M NaCl, pH 8. Flujo: 5 mL/min.
Buffer elución	Ácido cítrico 100 mM, pH 3,5 Flujo: 5 mL/min.	
Colección de la muestra	1,2 mL de elución + 120 µL de buffer 1M Tris-HCl, pH 9. En colector automático	

Tabla 4: Condiciones operativas de purificación de los anticuerpos monoclonales 24G12H8 y 52F2B9 a través de un sistema ÄKTA Start (GE Healthcare).

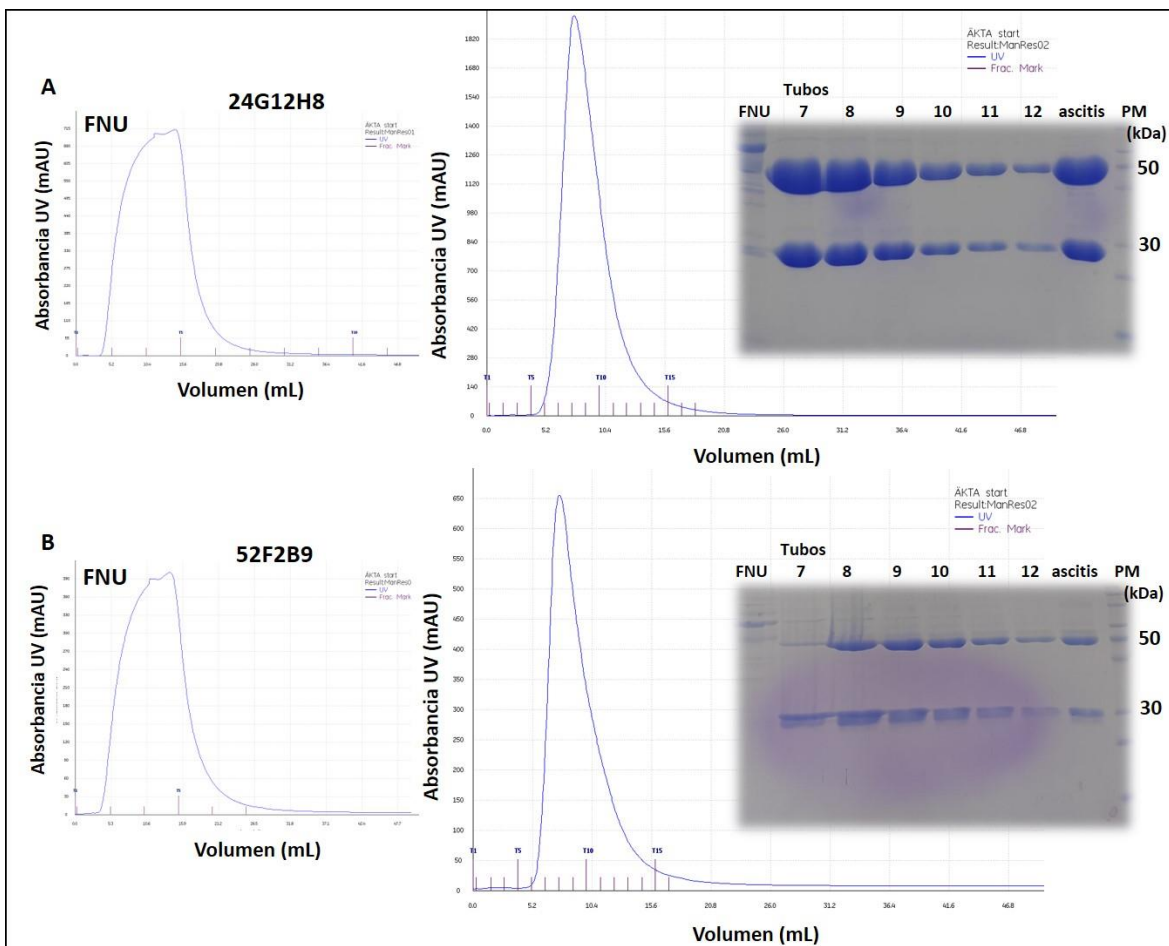


Figura 30. Purificación de anticuerpos monoclonales a partir de líquido ascítico y caracterización de eluatos. Cromatogramas de absorbancia UV vs. Volumen de la FNU (A y B, paneles izquierdos) y de las fracciones eluidas (A y B, paneles derechos) de la purificación por cromatografía de afinidad del equipo ÄKTA Start (GE Healthcare) de los clones 24G12H8 (A) y 52F2B9 (B). SDS-PAGE 10% bis/acrilamida teñidos con Coomassie Blue de los distintos tubos eluidos que presentaron absorbancia UV (A y B, a la derecha de sus respectivos gráficos de absorbancia).

electroforéticas pudimos detectar las bandas características correspondientes a las cadenas pesada y

liviana de los anticuerpos murinos. Se tituló IgG total, IgG2a (para 24G12H8) e IgG1 (para 52F2B9) por ELISA indirecto anti-HKBp dando títulos de 1/170.000 y 1/90.000 respectivamente (Figura 29B).

Procedimos luego a la purificación de los anticuerpos monoclonales anti-GroEL 24G12H8 y 52F2B9 de las ascitis generadas en ratones BALB/c (ver Materiales y Métodos para detalles de protocolo) a través de un sistema ÄKTA Start (GE Healthcare) de acuerdo a las condiciones recomendadas por el fabricante de la columna (Tabla 4) y bajo la operación de la Unidad de Desarrollo del IIFP.

En los gráficos de las Figura 30 se muestran los cromatogramas con los valores de absorbancia indicando los perfiles de purificación para el clon 24G12H8 (Figura 30A) y para el clon 52F2B9 (Figura 30B). A la izquierda se muestra un gráfico de carga de muestra y elución de la fracción no unida (FNU) y a la derecha un gráfico para la colección de fracciones de interés. Las distintas fracciones fueron analizadas en geles SDS-PAGE 10% bis/acrilamida (fotos a la derecha de los gráficos correspondientes). Todas las fracciones que presentaron anticuerpos se colectaron en un único tubo (*pool*), el cual fue dializado contra PBS. Luego de la diálisis se determinó la concentración proteica total por BCA (Tabla

Clon purificado	Concentración proteica (BCA)
H8 (IgG2a)	2776,26ug/mL
B9 (IgG1)	708,72ug/mL

Tabla 5. Concentración proteica medida por BCA de los anticuerpos monoclonales purificados por cromatografía de afinidad.

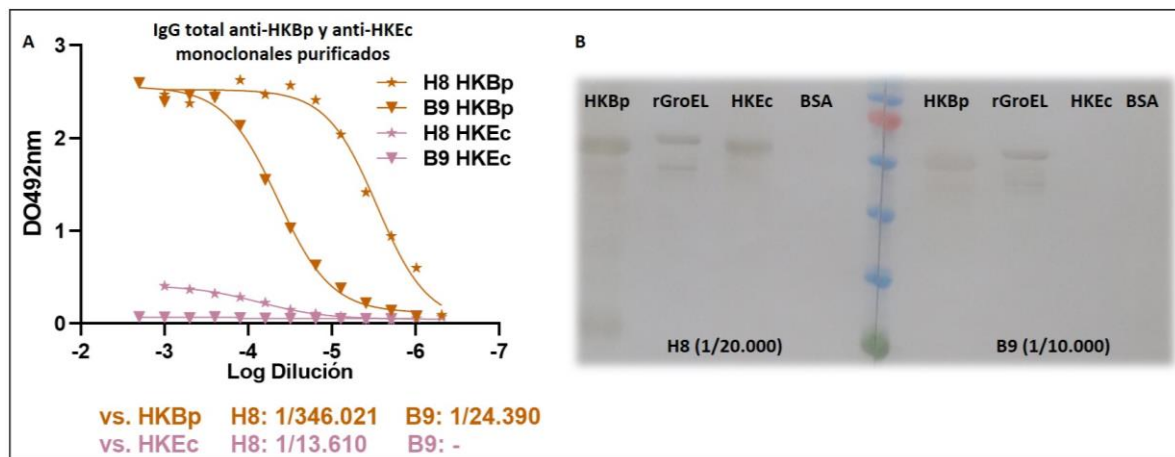


Figura 31. Caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-GroEL purificados. Titulación de anticuerpos IgG total anti-HKBp y anti-HKEc de los dos purificados (A). Western Blot de los dos purificados contra HKBp, GroEL recombinante (rGroEL), HKEc y BSA como control negativo (B).

5). Se calcularon los títulos IgG total anti-HKBp y anti-HKEc de los purificados (Figura 31A) y en base a dichos títulos hicimos un ensayo de inmunoblot contra HKBp, GroEL recombinante (rGroEL), HKEc y BSA como control negativo, revelando con un anti-ratón conjugado a peroxidasa. En la Figura 31B se observa que las reactividades contra GroEL de *B. pertussis* y *E. coli* (24G12H8) y contra GroEL de solo *B. pertussis* (52F2B9) se mantuvieron como antes de la purificación.

3.1.1. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-GroEL: Ensayos de aglutinación.

La aglutinación es un método de diagnóstico rápido que puede realizarse en placa o en tubo y resulta la técnica elegida por varios Centros Nacionales de Referencia Microbiológica para serotipificación. Los ensayos de aglutinación son pruebas inmunológicas sencillas y rápidas, aunque menos sensibles que otros métodos inmunométricos como, por ejemplo, la técnica de ELISA. El fenómeno de aglutinación se basa en la reacción antígeno-anticuerpo y permite identificar/serotipificar a simple vista una suspensión de células o partículas que presentan un antígeno en particular en su superficie o una solución que contenga determinados anticuerpos. La capacidad de aglutinación de un anticuerpo depende de la distribución de epitopes en la superficie de una partícula o bacteria como así también de la accesibilidad de estos epitopes. Entre las ventajas de las reacciones de aglutinación están su moderado grado de sensibilidad y la enorme variedad de sustancias identificables a través del uso de partículas que están recubiertas por antígeno o por anticuerpo.

Para el caso de *B. pertussis* se utiliza esta técnica para identificar distintas cepas circulantes, por ejemplo, diferentes serotipos fimbriales.

Teniendo en cuenta el elevado grado de conservación que presenta la chaperona GroEL entre las bacterias Gram-negativas, decidimos evaluar la capacidad y especificidad de los anticuerpos monoclonales generados de aglutinar distintas suspensiones bacterianas. Para ello, se incubaron 15 µl de suspensión de *B. pertussis* TOH, *B. pertussis* 1624 (aislamiento clínico de nuestro laboratorio), *E. coli* S17-1 ó *P. aeruginosa* ATCC sobre un portaobjetos con 15 µl de distintas diluciones de ascitis 24G12H8 ó 52F2B9. Como control positivo se usó un suero policlonal anti-FIM2. Se incubaron a temperatura ambiente moviendo suavemente el portaobjetos y se observó aparición de pequeños gránulos. En la Tabla 5 se especifican las reactividades relativas observadas. La ascitis del clon 24G12H8 tiene la

capacidad de aglutinar *E. coli* S17-1 y *P. aeruginosa* ATCC, mientras que la ascitis del clon 52F2B9 tiene la capacidad de aglutinar *B. pertussis* TOH, *B. pertussis* 1624, *E. coli* S17-1 y *P. aeruginosa* ATCC. Si bien la aplicación de este tipo de ensayos es acotada, nuestros resultados nos muestran que el clon 52F289, al menos en las diluciones 1/10 y 1/100, fue capaz de aglutinar dos cepas sólo de *B. pertussis*.

	<i>Bordetella pertussis</i> TOH	<i>Bordetella pertussis</i> 1624 (aislamiento clínico argentino)	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> ATCC	<i>E. coli</i> S17-1
Suero anti FIM2 (control +)	++++	-	-	-
Suero policlonal anti-BpOMV	nd	-	-	-
Ascitis 24G12H8 1/1	nd	-	++	++
Ascitis 24G12H8 1/10	nd	-	+	-
Ascitis 24G12H8 1/100	nd	-	nd	nd
Ascitis 52F2B9 1/1	+++	++	+	++
Ascitis 52F2B9 1/10	++	+	nd	nd
Ascitis 52F2B9 1/100	+	+	nd	nd
Ascitis 52F2B9 1/1000	nd	nd	-	nd

Tabla 6. Ensayo de aglutinación de bacterias B. pertussis TOH, B. pertussis 1624, E. coli S17-1 y P. aeruginosa con ascitis 24G12H8 y 52F2B9. Se incubaron a temperatura ambiente en portaobjetos suspensiones de bacterias con distintas diluciones de las ascitis anti-GroEL y se observó a simple vista la aparición de gránulos. -: no testeado, nd: no detectado, +, ++ y +++: determinación relativa de positividad en comparación al control positivo Suero anti-FIM2 (++++).

3.1.2. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-GroEL: capacidad protectora/opsonizante.

Para caracterizar funcionalmente los anticuerpos monoclonales generados, realizamos un ensayo de opsonofagocitosis el cual nos permite evaluar la capacidad del anticuerpo de reconocer y luego promover la fagocitosis del patógeno (para detalles ver sección “Capítulo 3” de Materiales y Métodos). La opsonofagocitosis es la internalización de bacterias opsonizadas con anticuerpos y/o proteínas del complemento por los macrófagos u otras células fagocíticas como los neutrófilos. Cuando

bacterias se recubren con anticuerpos IgG, éstas son reconocidas por los macrófagos y neutrófilos a través de los receptores FcγR específicos expresados en la superficie de los fagocitos. Cuando múltiples FcγR se comprometen simultáneamente, el fagocito internaliza la bacteria en un compartimento intracelular conocido como fagosoma, el cual se caracteriza por la presencia de especies reactivas de oxígeno, pH ácido y variadas enzimas degradantes que en la mayoría de los casos provoca la muerte de la célula bacteriana ⁴⁴⁸.

El ensayo realizado consistió en incubar durante 30 minutos en agitación y a 37°C a las bacterias *B. pertussis* y *B. parapertussis* que expresan la proteína verde fluorescente (*B. pertussis*-GFP y *B. parapertussis*-GFP) con distintas diluciones de las ascitis anti-GroEL 24G12H8 y 52F2B9. Luego de la incubación con las ascitis, las bacterias fueron centrifugadas y resuspendidas en medio de cultivo RPMI-SFB. Se procedió luego a mezclar las bacterias con una suspensión de células monocitos macrófagos murinos de la línea RAW 264.7. Luego de una incubación de 1h en agitación y a 37°C, se centrifugaron las suspensiones, se lavaron con PBS y resuspendieron en medio RPMI-polimixina. Se realizó una nueva

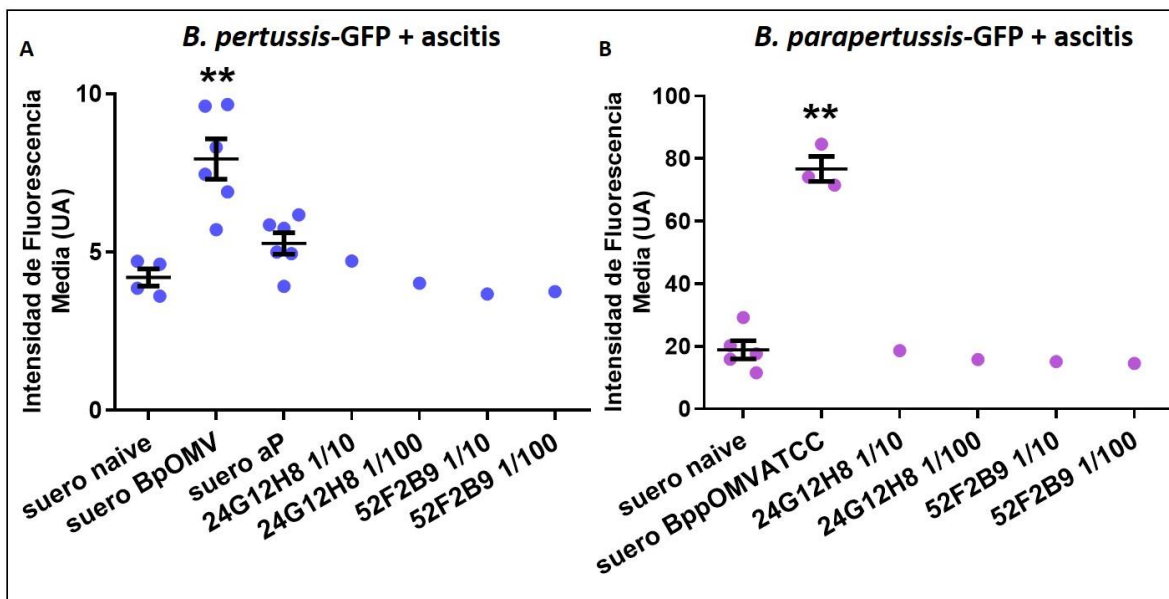
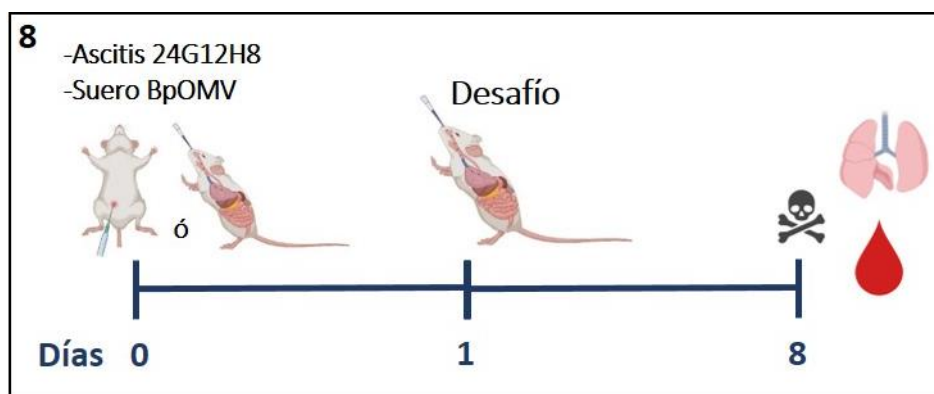


Figura 32. Ensayo de opsonofagocitosis por células RAW 264.7 de *B. pertussis* o *B. parapertussis* que expresan la proteína verde fluorescente GFP previamente incubadas con ascitis anti-GroEL. Medida de intensidad de fluorescencia media verde GFP sobre la población de células mieloides que internalizaron bacterias *B. pertussis*-GFP (A) y *B. parapertussis*-GFP (B) previamente incubadas con distintas diluciones de las ascitis anti-GroEL o sueros de ratones naíve o inmunizados con BpOMV, aP y BppOMVATCC como controles. Se grafica la media con su desviación estándar (SD). * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición pre-incubada con suero naíve (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

incubación durante 1 hora a 37°C y luego de centrifugar, lavar y resuspender en buffer FACS se analizaron las células por citometría de flujo. Como control positivo de opsonofagocitosis se preincubaron las bacterias *B. pertussis*-GFP con sueros provenientes de ratones inmunizados con BpOMV o la vacuna comercial aP, y las *B. parapertussis*-GFP con sueros provenientes de ratones inmunizados con BppOMVATCC derivadas de *B. parapertussis* ATCC. Como control negativo se incubaron las bacterias con suero proveniente de ratones naive. A través de medidas de intensidad de fluorescencia media GFP pudimos evidenciar que, en comparación al control negativo, las células fagocitaron más bacterias en el caso en que las mismas habían sido incubadas con sueros provenientes de ratones inmunizados con BpOMVs (para el caso de *B. pertussis*-GFP) y con BppOMVATCC (para el caso de *B. parapertussis*-GFP). Para las condiciones de pre-incubación con las ascitis 24G12H8 y 52F2B9 se observó una intensidad de fluorescencia media similar a los controles negativos, y por ello podemos decir que no son anticuerpos opsonizantes (Figura 32A y B).



Esquema 8. Esquema de ensayo de protección en el modelo de *B. pertussis* por inmunización pasiva inoculando ascitis anti-GroEL o suero de ratones previamente inmunizados con BpOMV vía i.p o i.n.

Si bien los anticuerpos monoclonales generados no muestran capacidad de intervenir en el proceso de opsonofagocitosis evaluado *in vitro*, nos propusimos evaluar si los mismos juegan algún rol en la protección contra *B. pertussis*. Para ello y como se muestra en el Esquema 8, empleamos el modelo murino en el que inoculamos ratones BALB/c naive vía i.p. (150 μ l) ó i.n. (50 μ ., dos veces) con ascitis del clon 24G12H8. A las 24 hs posteriores de la inoculación, los animales fueron desafiados intranasalmente con una suspensión subletal de *B. pertussis* TOH en PBS. Como

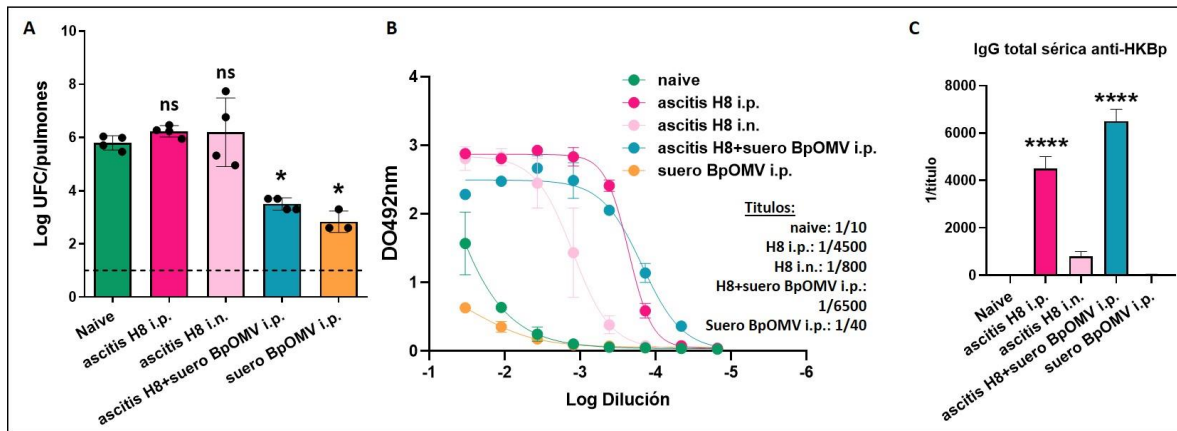


Figura 33. Ensayo de protección en el modelo murino de infección intranasal con *B. pertussis*. Recuento de UFC de *B. pertussis* en pulmones de ratones inmunizados con ascitis anti-GroEL vía i.p. o i.n., con suero inmune BpOMV como control positivo o combinación de ambos 24hs previo al desafío i.n. con una dosis subletal *B. pertussis* TOH (A). Titulación de anticuerpos IgG totales anti-HKBp en los sueros de los ratones del gráfico A (B). Gráficos de barras de los títulos de anticuerpos calculados en B (C). Grupos de 4 animales por tratamiento; se grafica la media con su desviación estándar (SD); la línea punteada indica el límite de detección del método. Gráfico representativo de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a su respectivo control naive (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$).

control de protección, inmunizamos de forma pasiva inoculando vía i.p. con 100 μ l de suero policlonal proveniente de ratones inmunizados con BpOMV³². Brevemente, se extrae sangre por punción submandibular de la vena superficial temporal, se separa el suero y se inocula i.p. en un ratón naive. Inmunizamos además a otro grupo de individuos con suero BpOMV en combinación con ascitis 24G12H8 vía i.p. En la Figura 33A se muestran los resultados alcanzados. Los mismos muestran que los grupos experimentales que recibieron suero policlonal BpOMV presentaron un recuento de UFC significativamente menor respecto del grupo naive. En los grupos que recibieron ascitis, no se observó una reducción del recuento de bacterias recuperadas de los pulmones mostrando que los anticuerpos monoclonales generados no son protectores en el modelo murino de infección por *B. pertussis*. Se titularon los anticuerpos IgG anti-HKBp en los sueros de los ratones del ensayo y se observa que los grupos inoculados con ascitis 24G12H8 i.p. presentan títulos significativamente más altos que los grupos naive, que el inoculado con ascitis 24G12H8 i.n. y que el inmunizado pasivamente con suero policlonal murino BpOMV (Figura 33B y C). Este resultado reconfirma, como ya es sabido, que no es posible correlacionar el título de anticuerpos con los niveles de protección en el humano ni en el modelo murino. En el caso de los títulos que se observan en la Figura 33B y C corresponden a los anticuerpos anti-GroEL en circulación luego de la inoculación sistémica i.p. de ascitis. A pesar de estos

altos títulos, no hay protección, tal como se demuestra con el ensayo de *clearance* bacteriano pulmonar (Figura 33A) y de opsonofagocitosis (Figura 32).

3.1.3. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-GroEL: uso para caracterización del tracking intracelular.

En esta sección mostramos los resultados alcanzados al evaluar si los anticuerpos monoclonales generados pueden ser usados para realizar estrategias de marcado intracelular o tracking de OMVs. Para ello, los anticuerpos anti-GroEL purificados fueron conjugados al fluorocromo Alexa Fluor 647 (AF647) (ver Materiales y Métodos). Con los mismos se replicó el ensayo de internalización de BpOMVs marcadas con CFSE descrito en el Capítulo 2 sección 2.7.

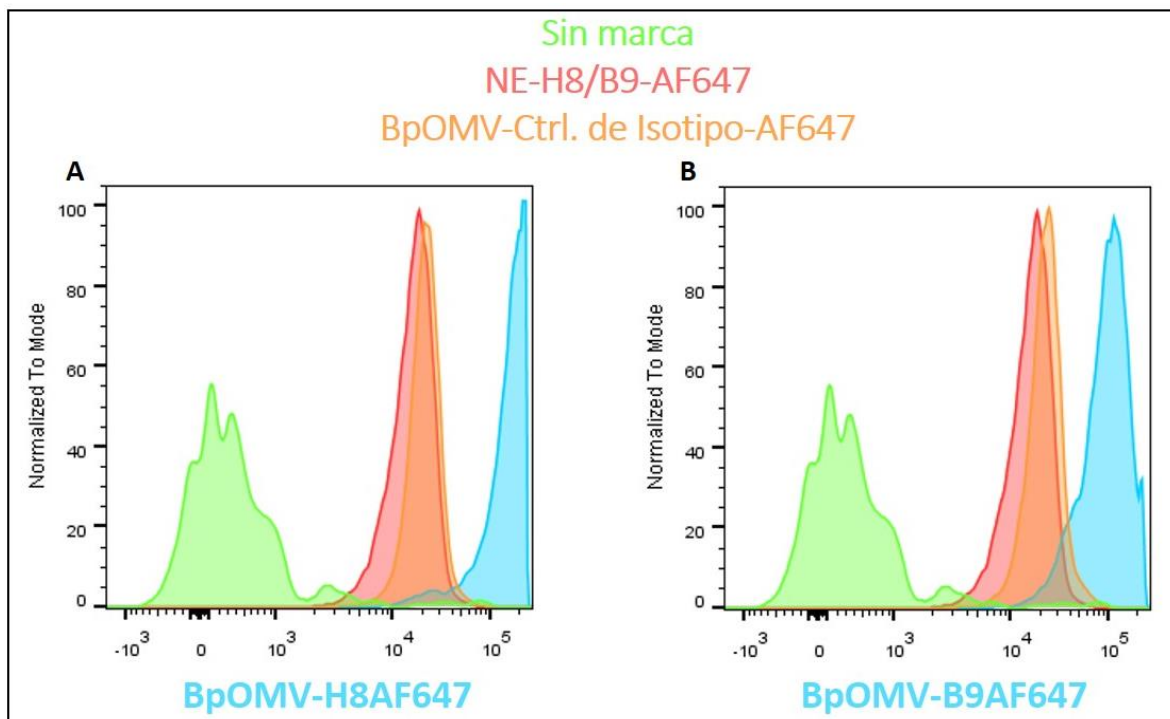


Figura 34. Análisis por citometría de flujo de internalización de BpOMVs en células J774 con los anticuerpos monoclonales purificados y conjugados a AF647. Histogramas de intensidad de fluorescencia media de AF647 de las distintas condiciones: sin marca (verde), no estimulado (NE, rojo) y estimuladas y marcadas con los anticuerpos monoclonales H8-AF647 (A) y B9-AF647 (B) (celeste), o marcadas con el control de isotipo (BpOMVs-Ctrl. de Isotipo-AF647, naranja).

Se estimularon células de la línea J774 con BpOMVs durante 5 hs a 37°C. Se levantaron las células, lavaron y marcaron con una sonda de viabilidad LIVE/DEAD y anticuerpos anti-F4/80-FITC, anti-CD11b-PerCPCy5.5 y los dos anticuerpos monoclonales anti-GroEL conjugados (H8-AF647 y B9-AF647). La estrategia de *gating* consistió en seleccionar primeramente las células mieloides por SSC-A vs. FSC-A, luego las células vivas por LIVE/DEAD-, y por último las CD11b+F4/80+. En el histograma correspondiente a la intensidad de fluorescencia media para el fluorocromo AF647 es posible distinguir de manera clara las distintas poblaciones celulares. En particular la población de células sin marcar (verde) se diferencia de la población no estimulada (NE, roja) marcada con H8-AF647 ó B9-AF647, y esa diferencia se manifiesta con el corrimiento del perfil del histograma hacia la derecha. Este corrimiento sobre el eje, indicador de intensidad de emisión de fluorescencia, fue diferente también de la población estimulada con BpOMVs y marcadas con el control de isotipo (naranja). Estas dos últimas poblaciones solaparon gran parte de sus histogramas. Las células que fueron estimuladas con BpOMVs y luego marcadas con cualquiera de los dos monoclonales H8-AF647 y B9-AF647 (celeste), se discriminaron como poblaciones diferentes respecto de las anteriormente mencionadas (Figura 34A y B).

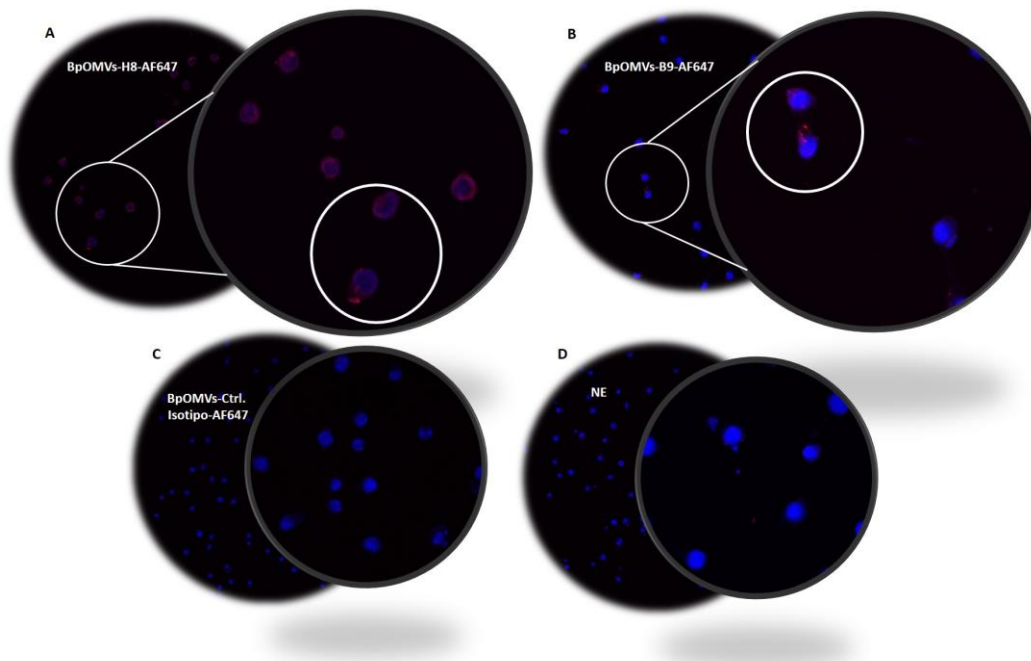


Figura 35. Microscopía confocal de internalización de BpOMVs marcadas con los anticuerpos monoclonales H8-AF647 y B9-AF647 en células J774. Células J774 estimuladas con BpOMVs durante 5hs se prepararon para microscopía y se marcaron núcleos con IP y con los anticuerpos monoclonales H8-AF647 (A) y B9-AF647 (B). Se usó un control de isotipo conjugado a AF647 como control negativo (C) y la condición no estimulada (NE) (D).

Los resultados alcanzados mostraron que existe un pegado inespecífico de los anticuerpos H8-AF647 y B9-AF647 a las células que no fueron estimuladas con BpOMVs. Más aún, el control de isotipo también presentó pegado inespecífico. Aunque estos hechos nos imposibilitan de sacar conclusiones precisas, la población estimulada con BpOMVs y marcada con los anticuerpos generados y conjugados, se distinguen manifiestamente del resto de las poblaciones. Tenemos previsto realizar más pruebas y ajustes de los protocolos.

Adicionalmente a esta caracterización realizamos un estudio por microscopía confocal en células J774 estimuladas durante 5 hs con BpOMVs. Para ello se marcaron los núcleos con IP y se incubaron con los anticuerpos H8-AF647 y B9-AF647. Los resultados alcanzados que se presentan en la Figura 35A muestran que para el anticuerpo H8-AF647 hay pegado inespecífico y por lo tanto no se puede identificar certeramente la presencia de BpOMVs internalizadas. La marca roja más intensa indicada con un círculo blanco podría corresponder a BpOMVs internalizadas, pero no podemos afirmarlo. En la Figura 35B, para el anticuerpo B9-AF647, se observa marca roja en el interior de una célula (indicado con un círculo blanco). Los controles de isotipo (Figura 35C) y NE (Figura 35D) no presentan marca roja. Si bien los resultados son promisorios en cuanto a la posibilidad de utilizar estos anticuerpos para esta técnica, es necesario seguir optimizando el protocolo.

3.1.4. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-GroEL: cuantificación de OMVs.

En los procedimientos de obtención de las OMVs a escala de laboratorio se requieren de métodos de validación y caracterización de cada lote producido. Para cada lote de OMVs se hacen controles de pureza, determinación de proteínas, evaluación a través de microscopía electrónica, geles de SDS teñidos con Coomassie e inmunoblots contra marcadores de virulencia involucrados en la protección. Recientemente se ha reportado a la técnica de citometría de flujo con potencial para cuantificar nanopartículas como las OMVs ⁴⁴⁹.

Para evaluar si nuestros anticuerpos monoclonales anti-GroEL purificados y conjugados al fluorocromo AF647 podrían ser utilizados para la cuantificación de BpOMVs por citometría, realizamos una primera aproximación con BpOMVs marcadas con CFSE (como se describió en el Capítulo 2, Sección 2.7. Ver Materiales y Métodos). Luego de la marcación con CFSE, se resuspendieron las BpOMVs en PBS

filtrado por filtro 0,22 μ m. Se usaron unas *Beads* sintéticas fluorescentes verdes de 0,2 μ m para fijar los parámetros de tamaño en el citómetro.

En la Figura 36A se muestran gráficos de *Dot Plot* con los parámetros de tamaño SSC-A vs. Complejidad FSC-A donde se visualizan *dots* aún en la condición de PBS filtrado. Esto indica que aún en esa condición de control negativo se observa presencia de partículas. Sin embargo, es posible observar diferencias cuantitativas entre las condiciones de BpOMVs sin marcar (s/m) y BpOMVs-CFSE y el control realizado con las *Beads*. Esto lleva a que las muestras se tomen durante un tiempo determinado (1 minuto) y no por cantidad fija de eventos (*dots*) adquiridos. En el histograma correspondiente al canal donde se detecta la señal para la marca CFSE, se pueden distinguir claramente la población BpOMVs marcadas con CFSE (naranja) de la población de BpOMVs no marcadas (celeste), que está solapada con la condición PBS (rojo) (Figura 36B).

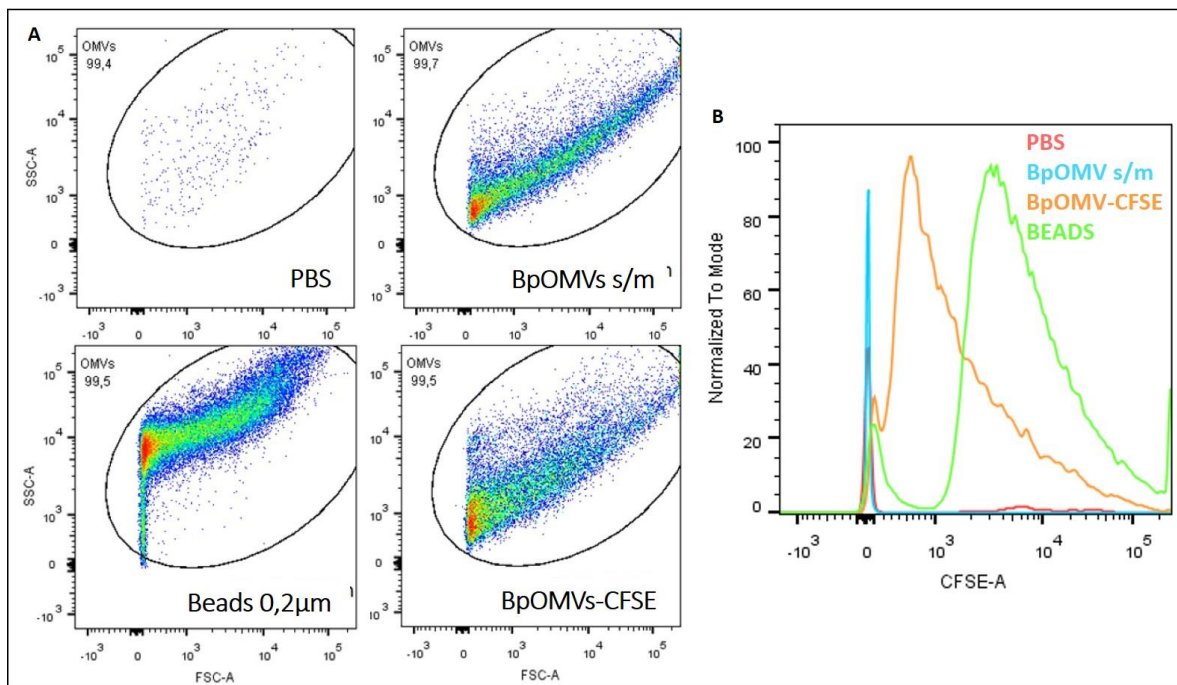


Figura 36. Análisis por citometría de flujo de BpOMVs marcadas con CFSE. Gráficos *Dot Plot* representativos de las distintas condiciones analizadas (A). Histograma de intensidad de fluorescencia media verde CFSE de los gráficos de A (B).

Estos ensayos fueron repetidos marcando a las BpOMVs con los anticuerpos monoclonales anti-GroEL provenientes de los dos clones 24G12H8 y 52F2B9 y conjugados a AF647. Se ensayaron dos diluciones de los mismos, 1/20 y 1/400. En la Figura 37 se observa que las BpOMVs marcadas con ambos

anticuerpos y a ambas concentraciones se discriminan claramente de los controles PBS (rojo), de las BpOMVs sin marcar (celeste) y de las BpOMVs marcadas con un control de isotipo conjugado a AF647 (verde oscuro).

Estos resultados, aunque preliminares muestran una posible utilización de los anticuerpos monoclonales para esta técnica. Se deben optimizar los protocolos de marcación y los controles para poder arribar a uno que nos permita la cuantificación efectiva de OMVs. Estos ensayos quedan planteados para un futuro cercano.

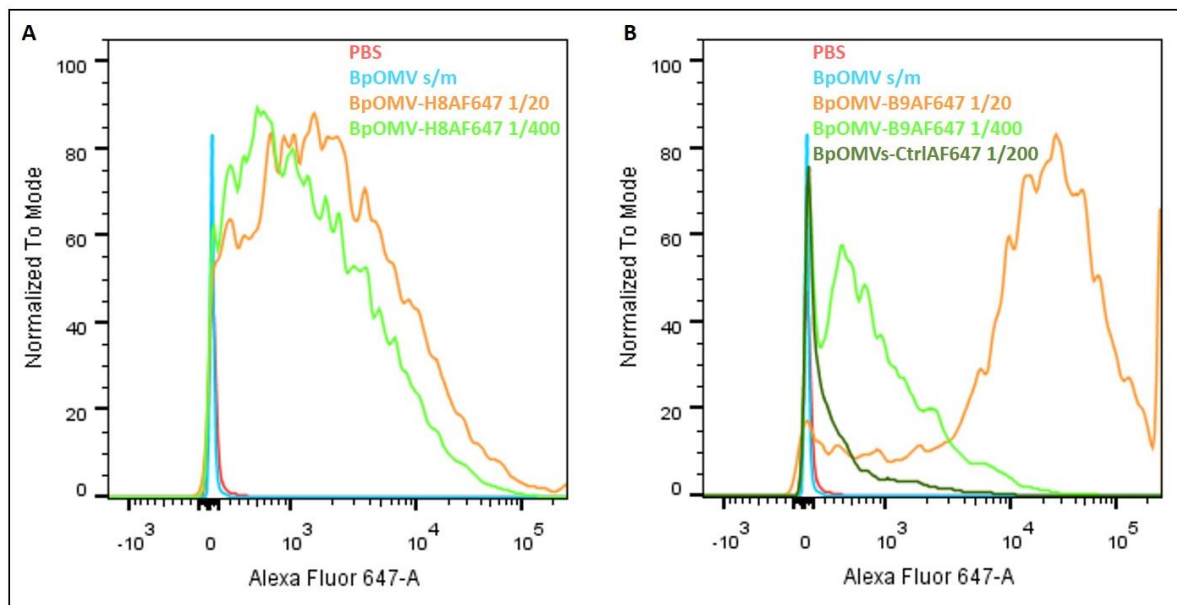


Figura 37. Análisis por citometría de flujo de BpOMVs marcadas con anticuerpos monoclonales anti-GroEL purificados y conjugados a Alexa Fluor-647 (AF647). Histograma de intensidad de fluorescencia media AF647 de BpOMVs marcadas con distintas diluciones de los anticuerpos del clon 24G12H8 (A) y del clon 52F2B9 (B) conjugados a AF647.

Discusión

En este capítulo describimos la generación de anticuerpos monoclonales anti-BpOMVs que fueron ensayados y puestos a disposición como herramientas para diferentes campos de aplicación.

Hemos podido generar dos clones productores de anticuerpos monoclonales denominados 24G12H8 y 52F2B9, ambos específicos para la proteína chaperona GroEL de *B. pertussis*. Estos anticuerpos fueron producidos, caracterizados, purificados y conjugados al fluorocromo AF647.

Como muchas otras chaperonas, GroEL y GroES también se conocen como proteínas de choque térmico (HSP), ya que el estrés por calor conduce a un aumento de proteínas mal plegadas como resultado de una alta temperatura no fisiológica^{447,450}. Se ha reportado la inmunodominancia de GroEL entre distintas especies de bacterias Gram-negativas como *Rickettsia* y *Brucella*^{451,452}. Para otras infecciones bacterianas, se ha demostrado que GroEL tiene potencial uso como vacuna, así, la inmunización de ratones con GroEL de *B. anthracis* induce una respuesta tanto humoral como de células T con capacidad protectora contra la infección⁴⁵³. De manera similar, se ha demostrado inmunidad protectora tras la inmunización con GroEL para la infección por *F. tularensis*, *M. tuberculosis*, *H. pylori*, *S. typhimurium* y *S. pneumoniae*⁴⁵⁴⁻⁴⁶⁰.

La inmunodominancia de GroEL sobre otros antígenos se evidencia en las BpOMVs, como demostramos en este Capítulo, y en la bacteria *B. pertussis*²⁷⁹. A diferencia de las bacterias antes mencionadas, se reportó que la inmunización con la proteína recombinante GroEL en ratones neonatos proporcionó poca protección contra el desafío con *B. pertussis*⁴⁶¹. Los anticuerpos monoclonales aquí generados tampoco resultaron ser protectores en el modelo murino de infección con *B. pertussis* como así tampoco presentaron capacidad opsonizante *in vitro* con células macrofágicas murinas.

Si bien hace falta optimizar protocolos, muchos son los estudios y líneas de trabajo en los que las herramientas aquí generadas podrían ser de utilidad, por ejemplo, en el estudio de la interacción huésped-hospedador de mecanismos de internalización de OMVs, tanto provenientes de *B. pertussis* como de otras bacterias Gram-negativas, o incluso de internalización de bacterias; en el desarrollo de candidatos vacunales; para la cuantificación de OMVs y/o bacterias, entre otros.

CAPÍTULO 4

APORTE EXPERIMENTAL A LA PANDEMIA CAUSADA POR EL VIRUS SARS-CoV-2

*“For I have learned to look on nature, not as in the hour of thoughtless youth, but hearing oftentimes
the still, sad music of humanity”*

Willian Wordsworth

Introducción

Los resultados que se presentan en el siguiente Capítulo son efecto del trabajo realizado bajo la dirección del Dr. Martín Rumbo desde agosto de 2020 hasta la fecha.

La COVID-19 fue declarada pandemia por la OMS en marzo de 2020, pocos meses después de que se identificara el nuevo virus SARS-CoV-2. Desde entonces, más de 421 millones de personas se infectaron a pesar de las diferentes medidas adoptadas para reducir la circulación viral ^{462,463}.

En el IIFP rápidamente se pusieron en marcha varios proyectos de investigación enfocados a aportar tanto desde lo experimental como desde lo teórico a la mitigación y conocimiento de la situación epidemiológica regional. Particularmente participé, con otros colegas y compañeros de distintos grupos del IIFP (los Dres. Romanin, Crivaro y Hiriart), en el proyecto de generación de anticuerpos monoclonales anti-proteínas RBD (Receptor Binding Domain, de la proteína S) y N (Nucleocápside) del virus SARS-CoV-2, como así también en un proyecto sobre el reposicionamiento de una droga como posible tratamiento de casos severos de COVID-19.

En la introducción del Capítulo 3 se mencionan las virtudes y numerosas aplicaciones que poseen los anticuerpos monoclonales en la clínica e investigación básica. Contando con la experiencia anteriormente mencionada es que nos propusimos desarrollar clones productores de anticuerpos monoclonales anti-proteínas RBD y N del virus SARS-CoV-2. Estos anticuerpos, dependiendo de las características de los mismos, podrían aplicarse en el desarrollo de distintas herramientas relevantes para el diagnóstico, tratamiento, estudio de la biología, entre otros aspectos, de la COVID-19. Son altos los costos de compra e importación de kits diagnósticos e insumos desde el exterior, lo que deriva en un acceso social desigual a los servicios e insumos de salud. Aportar a los esfuerzos de generar la capacidad e independencia como país de desarrollar nuestras propias herramientas e insumos de salud sería aportar a la soberanía nacional.

En cuanto a la enfermedad COVID-19, aunque la gran mayoría de las personas infectadas por el virus SARS-CoV-2 desarrollan formas leves o asintomáticas de la enfermedad, menos del 10% sufren una forma grave que puede evolucionar de una enfermedad de las vías respiratorias superiores a una neumonía (fase IIa de la enfermedad) con eventual compromiso sistémico (fase IIb de la enfermedad) y requerimiento de asistencia ventilatoria mecánica ⁴⁶⁴. Esta situación puede evolucionar finalmente hacia una fase inflamatoria de la enfermedad con potencial compromiso del sistema vascular con alteraciones de la hemostasia (fase III de la enfermedad), casos en los que la tasa de mortalidad no es despreciable. Se ha informado que los pacientes con COVID-19 que ingresan a UTI y requieren de

ventilación mecánica presentan una tasa de mortalidad entre el 30 y el 60% según el país, la situación epidemiológica local, entre otros factores ⁴⁶⁵⁻⁴⁷².

La principal complicación en los casos graves de COVID-19 es la falla respiratoria secundaria al síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), convirtiéndose en la principal causa de mortalidad. La evidencia acumulada sugiere que los pacientes con COVID-19 grave experimentan un síndrome hiperinflamatorio caracterizado por hipercitoquinemia fatal y fulminante asociada a falla multiorgánica, conocida como "tormenta de citoquinas" ⁴⁷³. Este mecanismo fisiopatológico propuesto de tormenta de citoquinas y cascada inflamatoria se basa en la evidencia recopilada principalmente durante las epidemias anteriores de SARS-CoV-1 y MERS-CoV, con un aumento significativo de IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN γ , CXCL10 y TNF α ⁴⁷⁴. Los datos recopilados durante la pandemia actual también muestran un aumento significativo de citoquinas inflamatorias, como G-CSF, IP10, MCP-1, MIP-1a y TNF α , entre otras, en aquellos pacientes que requirieron cuidados intensivos y presentaron síntomas graves ^{475,476}.

Además de la insuficiencia respiratoria debida al SARS-CoV-2, se ha reportado una alta incidencia de insuficiencia cardíaca aguda, daño cerebral, renal y hepático; así como eventos trombóticos que incluyen infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular, isquemia arterial aguda de las extremidades e intestino y enfermedad tromboembólica venosa ⁴⁷⁷. El aumento del riesgo de trombosis se origina por un desequilibrio en la función de las células endoteliales, las plaquetas y el sistema de coagulación secundario al proceso inflamatorio en un círculo vicioso generado por estos dos procesos que se refuerzan mutuamente, denominado inmunotrombosis ^{478,479}. Se ha observado que las terapias antitrombóticas combinadas con terapias anti-inflamatorias aumentan las posibilidades de recuperación de pacientes con COVID-19 severo ⁴⁸⁰.

Desde el comienzo de la pandemia por SARS-CoV-2, alrededor del mundo se han evaluado distintos tratamientos en diferentes ensayos clínicos para tratar los casos severos. Sin embargo, hasta el momento existen pocas alternativas terapéuticas específicas para los pacientes que desarrollan la enfermedad grave, una de las recomendadas por la OMS es el biológico Tocilizumab que bloquea el receptor de IL-6 (IL-6R), o la droga baricitinib bloqueante de las quinasas JAK1 y JAK2, ambos tratamientos utilizados para tratar la artritis reumatoidea. También se ha recomendado Anakinra que bloquea el receptor IL-1 β . o una combinación de anticuerpos neutralizantes contra el virus SARS-CoV-2 (<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-therapeutics-2022.1>). La FDA (Food and Drug Administration) ha recientemente autorizado la droga antiviral Paxlovid. Aunque promisorios ⁴⁸¹, debido a sus costos, este tipo de medicamentos son difíciles de usar a gran escala, especialmente en

países de bajos y medianos ingresos como el nuestro. Por ello, los esteroides como la dexametasona se han indicado como tratamiento de primera línea para pacientes con COVID severa, ya que se ha demostrado que esta intervención de manera temprana reduce la tasa de mortalidad de los pacientes con COVID-19 que reciben ventilación mecánica invasiva u oxígeno ⁴⁶⁸.

Un tratamiento efectivo para el manejo de pacientes con COVID-19 severa que presentan un compromiso respiratorio podría ayudar a prevenir la alta incidencia de muerte que se presenta por esta enfermedad en los pacientes ingresados a UTIs y el colapso de las mismas, ya que, a pesar de la implementación de vacunas, los brotes siguen siendo motivo de preocupación a nivel mundial. El reposicionamiento de medicamentos ha sido una actividad importante en la búsqueda de tratamientos seguros y asequibles ya que pueden posicionarse fácilmente para su aplicación clínica. Los recortes considerables en los costos de I + D y la reducción en los plazos de desarrollo de medicamentos son los principales impulsores de la reutilización de drogas en el escenario pandémico.

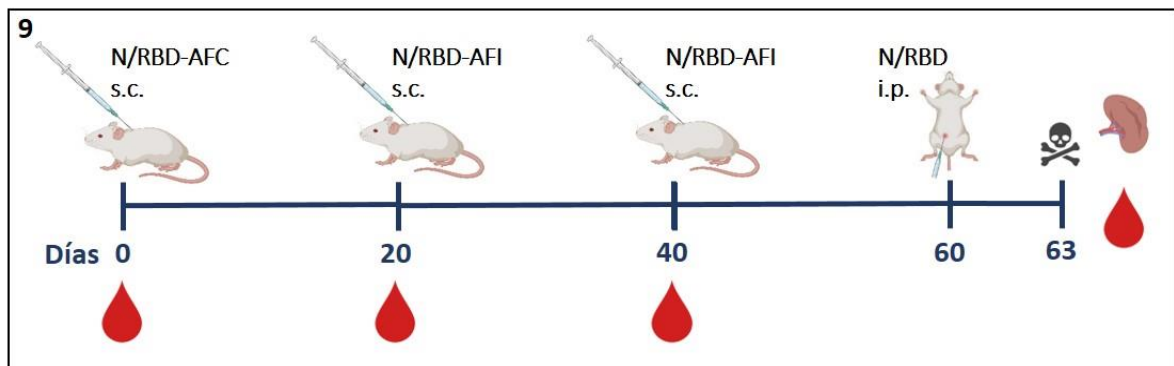
En este contexto, se ha propuesto el uso de la lidocaína como fármaco inmunomodulador y anti-inflamatorio. La lidocaína es un anestésico local, también utilizado como agente antiarrítmico con efecto anti-inflamatorio, que actualmente está aprobado para el tratamiento de arritmias cardíacas. Su mecanismo de acción es a través de su capacidad de inhibir la entrada de sodio por los canales rápidos de la membrana celular. Además de las aplicaciones como anestésico local o antiarrítmico, diferentes estudios que evaluaron la administración de lidocaína intravenosa de forma perioperatoria demostraron que tiene efectos positivos al atenuar la respuesta inflamatoria ⁴⁸²⁻⁴⁸⁴. Se ha demostrado que la lidocaína es capaz de inhibir las vías de señalización inflamatorias centrales, como la de vía NF- κ B en neutrófilos y otros leucocitos ^{485,486}. Curiosamente, se ha demostrado que la administración intravenosa de lidocaína atenúa la inflamación de las vías respiratorias inferiores en un modelo de lesión por isquemia-reperfusión ⁴⁸⁷.

Por todo esto nos propusimos, por un lado, generar anticuerpos monoclonales anti proteínas del SARS-CoV-2 con potencial aplicación principalmente en diagnóstico y, en segundo lugar, evaluar la capacidad anti-inflamatoria/inmunomoduladora de la lidocaína en combinación con la dexametasona, anticipando la posibilidad de que esta combinación de fármacos mejore el impacto del tratamiento con corticosteroides para los pacientes COVID-19 graves.

4.1. Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-proteínas RBD y N del virus SARS-CoV-2.

Se procedió a la generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-proteínas N y RBD del virus SAR-CoV-2 con la técnica descrita anteriormente de Milstein y Köhler ⁴⁴⁵ (Ver Materiales y Métodos, sección Capítulo 4).

Inmunizamos por vía subcutánea (s.c.) 5 ratones por lote de la cepa BALB/c, con al menos 3 dosis de 20 µg de proteína N o RBD formuladas con Adyuvante de Freund Completo (AFC) la primera dosis, las subsiguientes con Adyuvante de Freund Incompleto (AFI), cada 20 días como se muestra en el Esquema 9. Se tomaron muestras de sangre a partir de la primera inmunización y titulamos anticuerpos IgG séricos totales anti-N o anti-RBD para elegir el ratón de mayor título para fusionar el bazo.



Esquema 9. Esquema de inmunización con proteína N ó RBD del virus SARS-CoV-2 por vía s.c. para producción de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales.

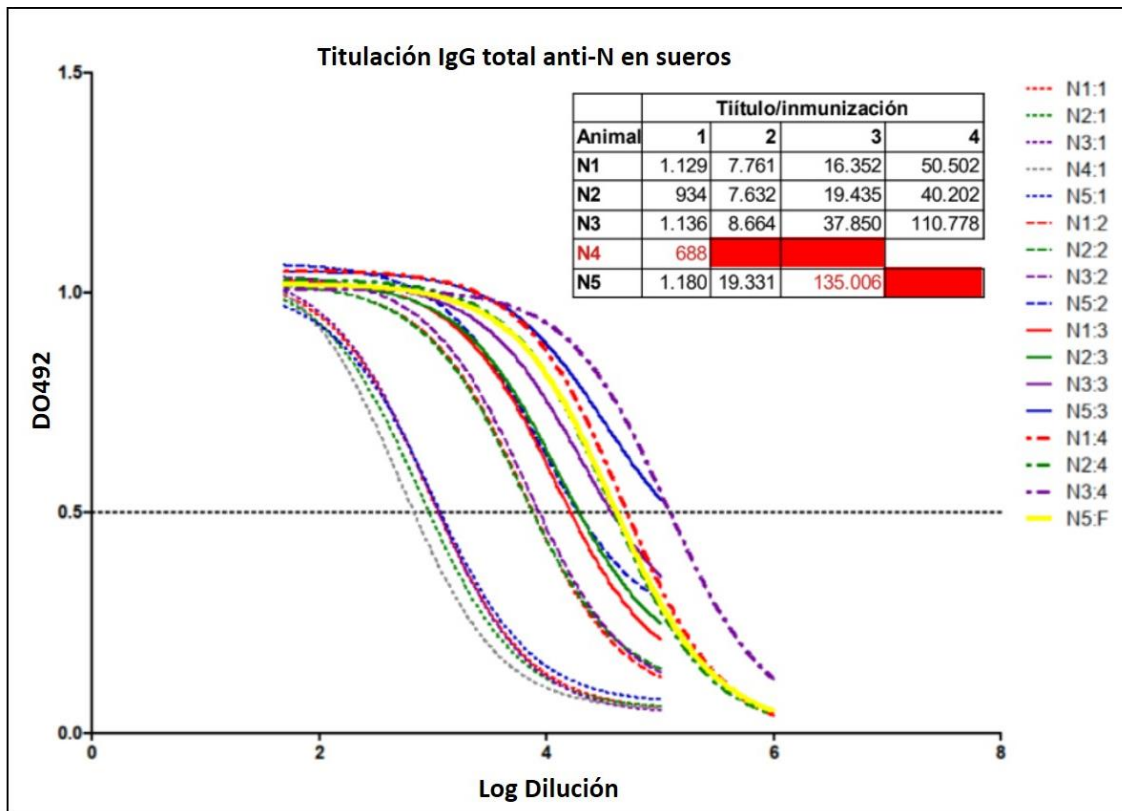
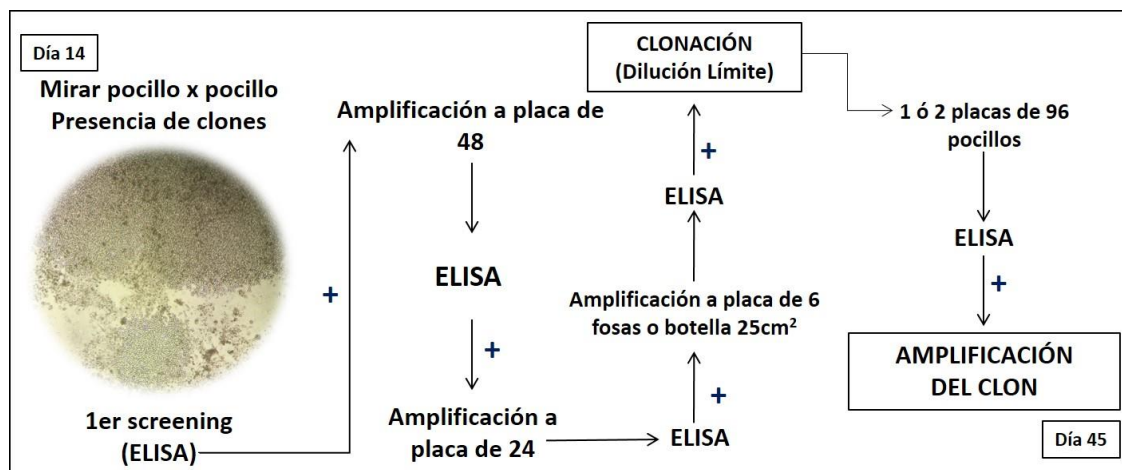


Figura 39. Seguimiento de títulos IgG total anti-N en sueros de ratones inmunizados con proteína N (en AFC/AFI durante las 4 primeras inmunizaciones. A partir de la 3ra dosis se selecciona el individuo con mayor título para proceder a la fusión (N5). El resto se siguió inmunizando cada 20 días.



Esquema 10. Esquema de screening desde la visualización de células en crecimiento en las placas de fusión hasta la amplificación del clon productor de anticuerpos monoclonales.

En la Figura 39 se muestra como ejemplo un gráfico de seguimiento de títulos de anticuerpos IgG séricos de los distintos individuos del lote de ratones inmunizados con proteína N. Se observa el aumento gradual de los títulos conforme se efectuaron las inoculaciones. Uno de los ratones murió luego de la primera dosis (N4), y el ratón N5 fue el primero en seleccionarse para la fusión del bazo. La curva N5:F corresponde a la titulación del suero del ratón seleccionado para la fusión al día del sacrificio. El resto de los individuos se siguió inmunizando cada 20 días con las mismas dosis antes mencionada. Tres días antes del día del sacrificio se inocularon con 10 µg de proteína N o RBD en PBS (*boost*) vía i.p. Los esplenocitos se fusionaron con células NS0 con PEG (ver Materiales y Métodos para detalles de protocolo) y plaqueamos en cinco placas de 96 fosas con medio selectivo HAT. Siete días después del plaqueo, se realimentan las fosas y a la semana siguiente comenzó el *screening* por microscopía observando fosa por fosa presencia de células en reproducción. Luego se procedió a analizar por ELISA indirecto anti-RBD o anti-N los sobrenadantes de cultivo de las fosas que presentaron crecimiento de células (Esquema 10).

Seleccionamos 2 hibridomas a los cuales llamamos 5D3 (anti-RBD) y 5E9 (anti-N) cuyos sobrenadantes presentaron una buena señal de DO por ELISA indirecto de IgG total anti-RBD o anti-N. Se isotipificaron por ELISA indirecto anti-RBD o anti-N contra IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, resultando ser ambos IgG1. Se clonaron por dilución límite los dos hibridomas y aquellas fosas que mantuvieron las características de reactividad por ELISA fueron expandidas. Finalmente seleccionamos dos clones de cada especificidad: 3G10 y 5F2 (anti-RBD), 1B9 y 2A4 (anti-N).

Procedimos a generar líquido ascítico en ratones BALB/c y Nude (ver Materiales y Métodos para detalles de protocolo).

Brevemente, inoculamos i.p. 10 ratones con Pristane una semana antes de la inoculación de $\approx 1 \times 10^6$ células de cada clon (5 ratones/clon). Monitoreamos diariamente los ratones hasta que la colecta

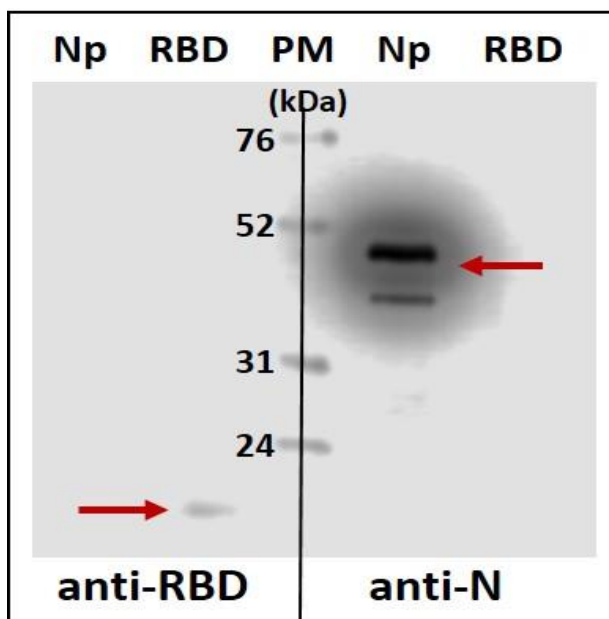


Figura 40. Western Blot de los anticuerpos monoclonales purificados anti-RBD y anti-N contra las proteínas RBD y N. Se corrieron las proteínas recombinantes en gel 10% de bis/acrilamida, se transfirieron a membrana de nitrocelulosa, incubaron con los anticuerpos monoclonales purificados y revelaron con un anticuerpo anti-ratón-HRP.

abdominal de líquido ascítico fue evidente y se prosiguió a la punción peritoneal y colecta de ascitis. Desde el momento de la primera punción y hasta el punto final, los ratones se inocularon s.c. con Tramadol (analgésico) diariamente. Se poolearon las ascitis de cada clon y se prosiguió a la purificación.

Los anticuerpos monoclonales anti-RBD y anti-N de las ascitis generadas fueron purificados por la Unidad de Desarrollo del IIFP (ver sección Materiales y Métodos para detalles de protocolo) a través de un sistema ÄKTA Start (GE Healthcare) de acuerdo a las condiciones recomendadas por el fabricante de la columna. Se corrieron los eluatos en un gel SDS-PAGE, se *poolearon* los tubos que presentaban anticuerpos, se dializaron contra PBS, se titularon y analizaron por Western Blot (Figura 40), confirmando su especificidad.

4.1.1. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-RBD y anti-N: diagnóstico de COVID-19.

Se trabajó en colaboración con profesionales del Instituto Malbrán (Dra. Elsa Baumeister, Servicio Virosis Respiratorias. Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Respiratorias Virales. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. INEI ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”), quienes nos proveyeron de improntas de células Vero infectadas con el virus SARS-CoV-2 cepa Wuhan. Dichas improntas se usan para realizar ensayos con distinta finalidad. Por un lado, pueden emplearse para la detección de anticuerpos específicos en pacientes con COVID-19 (sobre todo al inicio de la pandemia cuando en el INEI-Malbrán se aisló y caracterizó el virus y se desarrolló y validó el diagnóstico por PCR que luego fue derivado a todos los centros de salud). Por otro lado, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) se emplea como control de la capacidad infectiva de cepas de SARS-CoV-2 en distintos ensayos de producción/investigación en el INEI. La determinación de proteínas de SARS-CoV-2 en células infectadas como control de lote productivo se realiza en el INEI con muestras de sueros de pacientes infectados sobre las improntas, revelando con un policlonal generado en cabra, anti-Ig-humano-FITC en azul de Evans como contracolor y observando al microscopio de fluorescencia.

Evaluamos entonces si podíamos repetir la técnica de IFI con nuestros anticuerpos monoclonales ya que la utilización de éstos presenta ventajas en comparación con el uso de sueros humanos infectados/vacunados, desde la seguridad, el conocimiento de la concentración de anticuerpos, la versatilidad, la reproducibilidad, la disponibilidad, entre otras. Incubamos las improntas

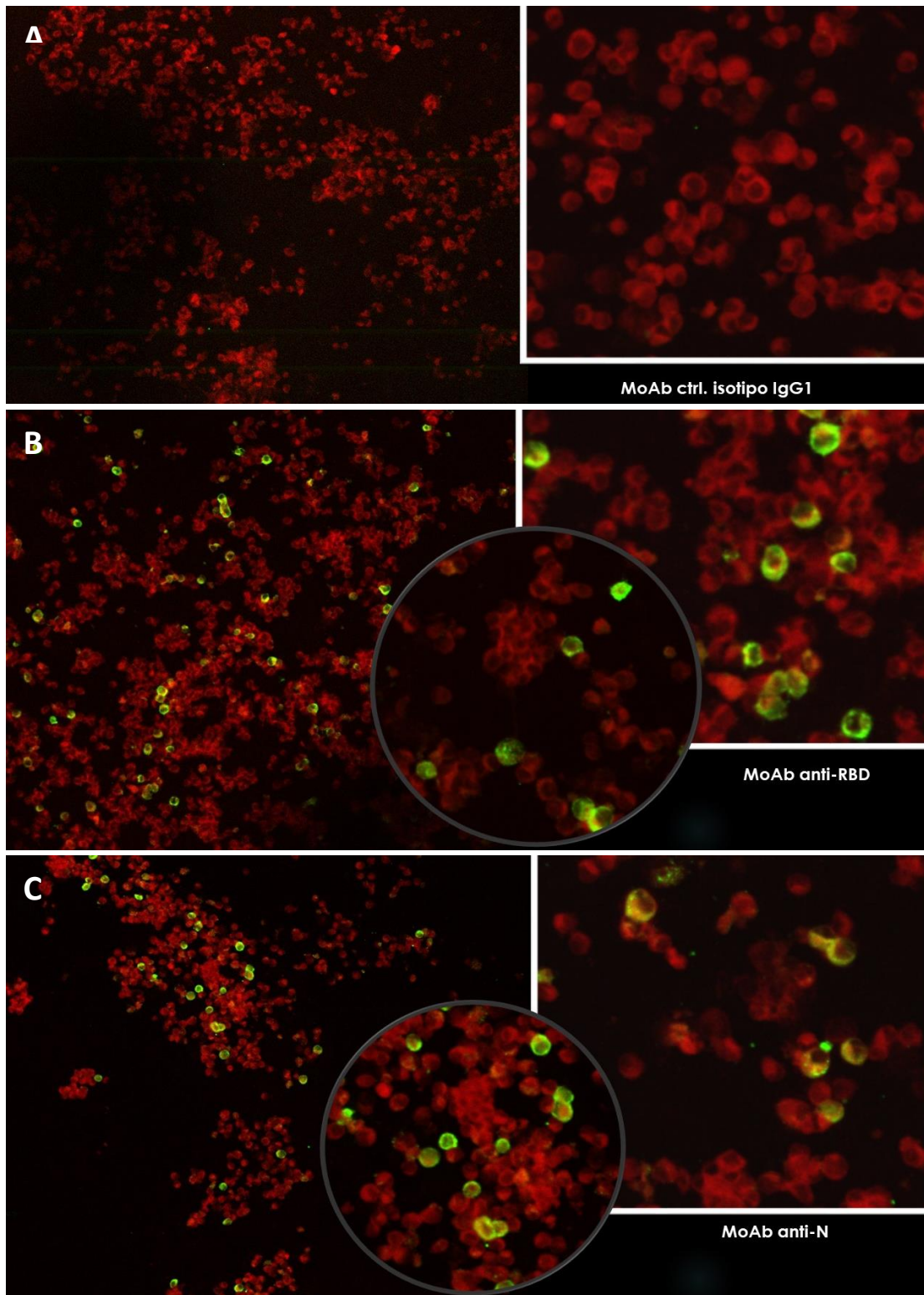


Figura 41. Inmunofluorescencia indirecta de los anticuerpos monoclonales anti-RBD y anti-N generados y purificados. Microscopía confocal de células Vero infectadas con SARS-CoV-2 cepa Wuhan, incubadas con los anticuerpos monoclonales producidos y purificados, revelado con un policlonal anti-mouse-AF488. Ctrl. de isotipo (A), monoclonal anti-RBD (B) y monoclonal anti-N (C).

con distintas diluciones de los anticuerpos monoclonales anti-RBD y anti-N purificados, usando como control positivo suero de los ratones utilizados para las fusiones del bazo. Revelamos con un policlonal hecho en cabra, anti-Ig-ratón-AF488 en azul de Evans como contracolor (las células negativas se ven rojas, las positivas, verdes) y observamos al microscopio confocal. Como se observa en la Figura 41, se pueden distinguir claramente las células positivas infectadas por el virus SARS-CoV-2 (verdes) de las negativas (rojas). Como control negativo se usó un anticuerpo monoclonal IgG1 de especificidad no relacionada (Figura 41A).

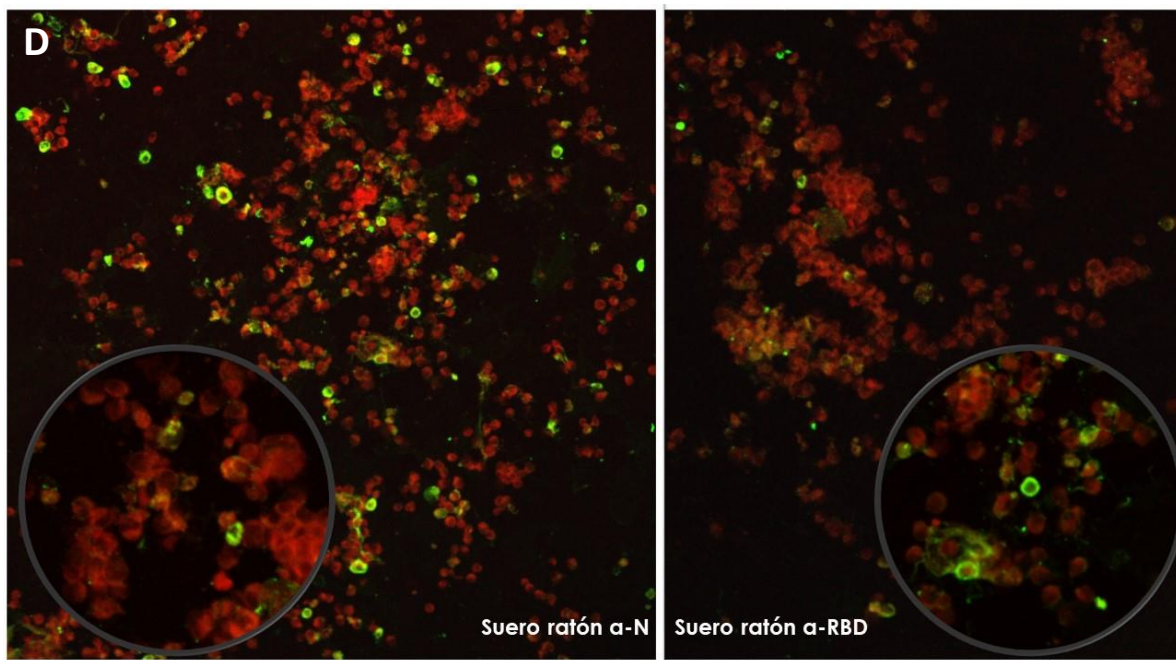


Figura 41D. *Inmunofluorescencia indirecta de los anticuerpos monoclonales anti-RBD y anti-N generados y purificados. Microscopía confocal de células Vero infectadas con SARS-CoV-2 cepa Wuhan. Control positivo: incubación con sueros de ratones del día de la fusión de bazo (inmunizados con proteína N a la izquierda, inmunizado con proteína RBD a la derecha) y revelado con un policlonal anti-mouse-AF488 (D).*

Los controles positivos con los sueros de los ratones utilizados para producir los hibridomas (Figura 41D) dieron acorde a lo evaluado. Se observa comúnmente la diferencia en cuanto a la nitidez y claridad de las imágenes por IFI entre el uso de sueros (tanto de ratón como humanos) y anticuerpos monoclonales. En las Figuras 41B y C versus la 41D se evidencia que en esta última hay marcado y fluorescencia verde inespecífica, probablemente debido a debris y restos celulares producto del protocolo de generación de las improntas de células Vero infectadas y la composición compleja de los

sueros. El uso de anticuerpos monoclonales además de ser más práctico, versátil y seguro para los ensayos de IFI en las improntas, tiene la ventaja de que se obtienen imágenes de mayor calidad.

Por otro lado, está en proceso de desarrollo (a cargo de la Unidad de Desarrollo del IIFP en colaboración con otros equipos de investigación de la UNLP), un kit diagnóstico de tiras reactivas por detección de antígeno utilizando el anticuerpo monoclonal anti-N generado. Se está trabajando también en incorporar los anticuerpos generados al panel de anticuerpos de diagnóstico de virosis respiratorias por la técnica de inmunofluorescencia directa utilizado en hospitales.

4.1.2. Aplicación de los anticuerpos monoclonales anti-RBD y anti-N: capacidad neutralizante.

En colaboración con los Dres. Alejandro Aiello y Alejandro Orlowski del Centro de investigaciones Cardiovasculares (CIC) de la Facultad de Cs. Médicas de la UNLP, se realizó un ensayo de la capacidad neutralizante de los dos anticuerpos monoclonales generados en un sistema de pseudovirus que se ha puesto a punto en dicho instituto. Brevemente, se co-transfectan células HEK293T con un vector de expresión del gen de la proteína S del virus SARS-CoV-2 y un vector lentiviral con genes reporteros luciferasa y eGFP (GFP potenciado por sus siglas en inglés). Los lentivirus generados (con proteína S en su cápside) se incuban con un cultivo de células previamente transfectadas para que expresen el receptor ACE2, receptor de células de mamíferos al cual se une el virus SARS-CoV-s a través del dominio RBD de la proteína S. Las células infectadas por estos pseudovirus expresarán la proteína verde eGFP y presentarán actividad luciferasa una vez lisadas y medida su actividad. El ensayo de neutralización consiste en incubar los lentivirus generados con distintas diluciones de los anticuerpos monoclonales purificados previamente a la infección de las células que expresan ACE-2 en su superficie. Por último, se analiza la capacidad neutralizante por microscopía de fluorescencia (expresión de eGFP) y por actividad enzimática luciferasa.

El anticuerpo monoclonal anti-RBD presentó una fuerte capacidad neutralizante mientras el anti-N, como era de esperarse, no presentó variación en cuanto expresión de eGFP ni en cuanto actividad luciferasa (Figura 42A y B).

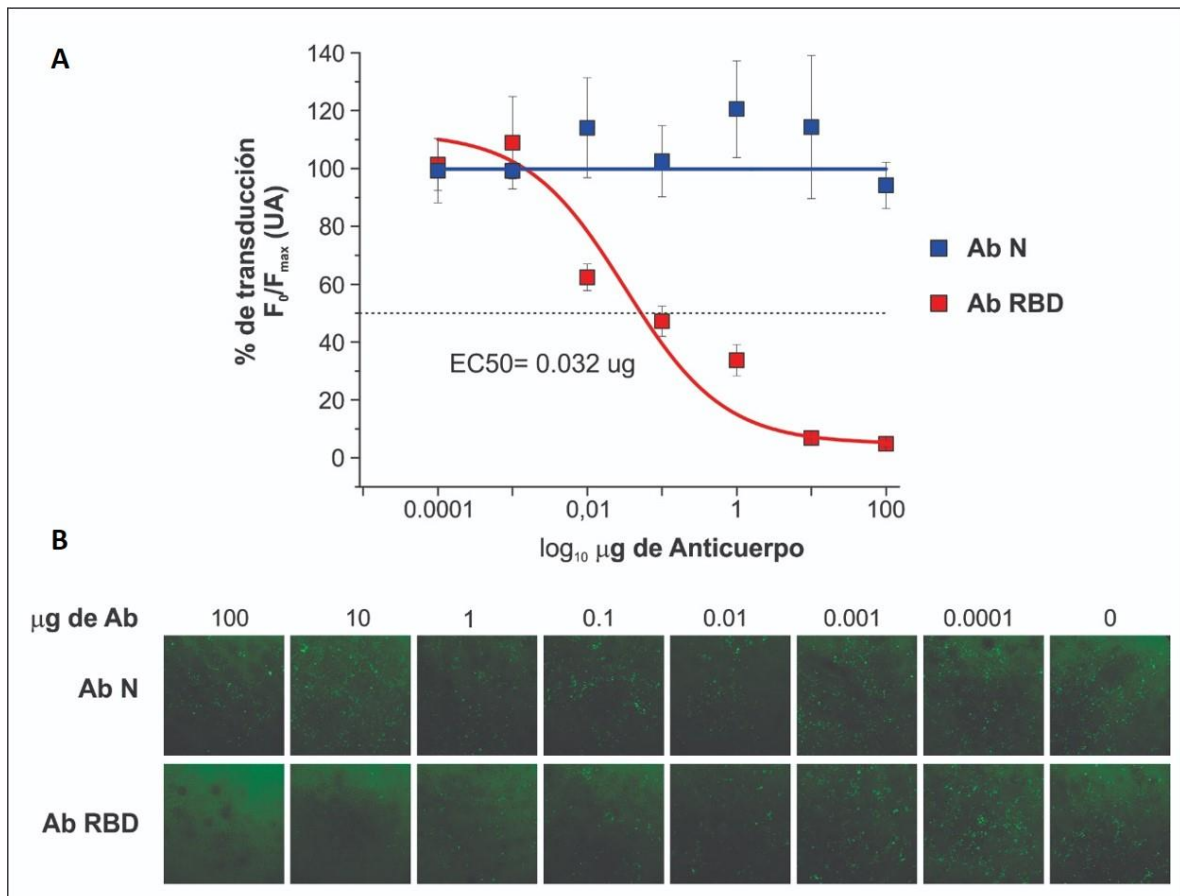


Figura 42. El anticuerpo monoclonal anti-RBD presenta capacidad neutralizante en un sistema de infección por pseudovirus que expresa la proteína S del virus SARS-CoV-2. Medida de actividad luciferasa (A) y expresión de eGFP (B) en células HEK293T infectadas con pseudovirus que expresan la proteína S del virus SARS-CoV-2 y que previamente fueron incubados con distintas diluciones de los anticuerpos monoclonales anti-N y anti-RBD.

4.2. Generación de evidencia *in vitro* de la capacidad inmunomoduladora de la lidocaína y de manera aditiva a la dexametasona, como posible reposicionamiento terapéutico para pacientes COVID-19 severos.

Para este objetivo nos propusimos usar distintas líneas celulares mieloides y epiteliales murinas y humanas, con distintos estímulos pro-inflamatorios tanto agonistas de ligados Toll, como distintas citoquinas proinflamatorias de relevancia en los cuadros severos de COVID-19. Además, en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Geffner del INBIRS y la Dra. Baumeister del Instituto Malbrán, evaluamos la capacidad moduladora de la lidocaína en distintos modelos de infección *in vitro* por el virus SARS-CoV-2

4.2.1. La lidocaína y la dexametasona son capaces de modular de manera aditiva distintas vías inflamatorias de señalización vía receptores Toll.

Para evaluar si la lidocaína tiene capacidad de modular la respuesta pro-inflamatoria, procedimos a estimular las líneas monocíticas macrofágicas murinas RAW 264.7 y J774 y humana THP-1 con poly I:C, un agonista de TLR3, ampliamente usado como simulación de infección viral a virus ARN (como el SARS-CoV-2). Pre-tratamos durante 30 min dichas líneas celulares con distintas cantidades de lidocaína, la cual mantuvimos durante todo el ensayo, y estimulamos con 40ng/mL de poly I:C. Luego de la incubación, medimos citoquinas pro-inflamatorias en sobrenadantes de cultivo: mL-6 en el caso de células RAW 264.7 y J774 y hIL-8 en el de THP-1. En los tres casos se observa modulación de la secreción de citoquinas proinflamatorias en comparación con el control estimulado y no modulado, de una forma dependiente de la dosis. Para el caso de RAW 264.7, la secreción de mL-6 disminuye

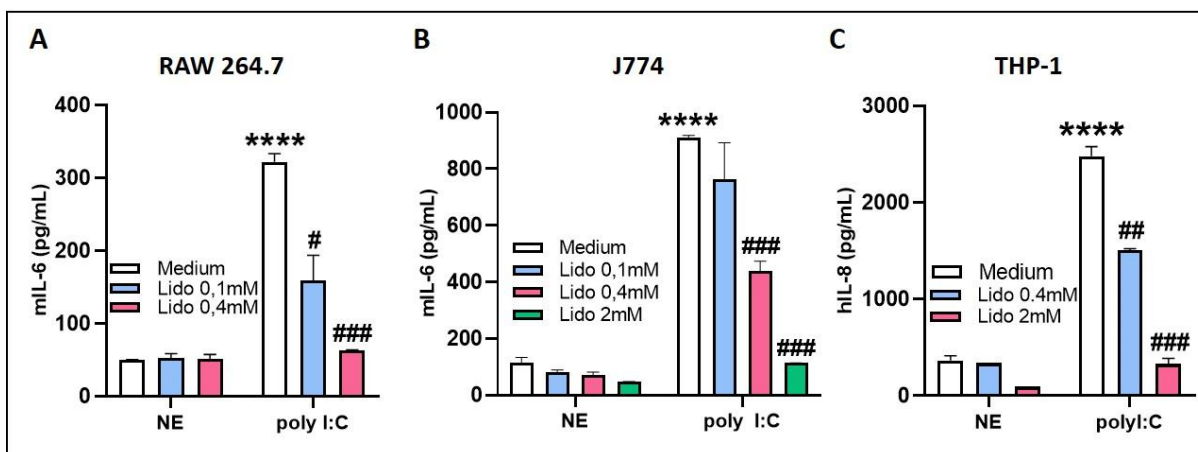


Figura 43. Capacidad inmunomoduladora dosis-dependiente de la lidocaína sobre distintas líneas monocíticas macrofágicas estimuladas con el agonista TLR3 poly I:C. Las células RAW 264.7 (A), J774 (B) y THP-1 (C) se estimularon con poly I:C en presencia de diferentes concentraciones de lidocaína. Las citoquinas pro-inflamatorias, mL-6 (A y B) y hIL-8 (C), se midieron en sobrenadantes. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no estimulada (NE) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$). # indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición estimulada no modulada (# $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$ y ### $p \leq 0.001$).

significativamente para las condiciones estimuladas con poly I:C y moduladas con lidocaína 0,1 y 0,4 mM en comparación a la condición estimulada con poly I:C ($p < 0,05$, Figura 43A). Para J774, se observa una modulación significativa similar de secreción de mL-6 para las condiciones tratadas con lidocaína

0,4 y 2mM en comparación con el control no tratado, pero no se observa diferencia significativa para la condición tratada con 0,1mM de lidocaína ($p < 0,001$, Figura 43B). En el caso de THP-1, la secreción de hIL-8 se ve significativamente inhibida para los casos tratados con 0,4 y 2mM de lidocaína ($p < 0,01$, Figura 43C).

Teniendo en mente la necesidad de contar con un terapéutico efectivo y accesible de manera masiva para el tratamiento de pacientes severos de COVID-19, diseñamos ensayos similares al recién presentado, pero usando una combinación de lidocaína con el corticoide dexametasona, droga que se usa en primera línea para pacientes COVID-19 ingresados a UTI.

Pre-tratamos células RAW 264.7 con distintas concentraciones de lidocaína, en combinación o no con dexametasona 0,5 μ M y medimos mL-6 en sobrenadante de cultivo. Nuevamente observamos que hay una disminución significativa en la secreción de mL-6 en todas las condiciones tratadas en comparación con la condición estimulada no modulada ($p < 0,0001$, Figura 44A). Por otro lado, se observa acción aditiva de la lidocaína 0,2mM + dexametasona 0,5 μ M en el caso de estimulación con poly I:C en comparación con la acción de sólo lidocaína 0,2mM ($p < 0,05$). Las mismas células estimuladas con flagelina (FliC) y moduladas con lidocaína 0,2mM + dexametasona 0,5 μ M secretaron significativamente menos cantidad de mL-6 en comparación con sus contrapartes moduladas sólo con lidocaína 0,2mM o con dexametasona 0,5 μ M ($p < 0,01$, Figura 44A). En células THP-1 humanas estimuladas con ECLPS se observa también que la secreción de hIL-8 disminuye significativamente en todas las condiciones moduladas ($p < 0,0001$), y la combinación de lidocaína 1mM con dexametasona 1 μ M induce una secreción significativamente menor de hIL-8 en comparación con ambas contrapartes moduladas sólo con lidocaína 1mM o sólo dexametasona 1 μ M ($p < 0,05$, Figura 44B).

Por otro lado, probamos un rango más amplio de concentraciones y combinaciones de moduladores en células THP-1 estimuladas con el agonista TLR2 Pam3Cys-SKKKK. Todas las condiciones moduladas dieron significativamente menor secreción de hIL-8 comparado con la condición en ausencia de los moduladores. Además, en prácticamente todos los casos, la acción aditiva de la dexametasona a la lidocaína dio diferencias significativas a todas las concentraciones usadas comparando con sus contrapartes moduladas sólo con lidocaína (a la misma concentración) (Figura 44C).

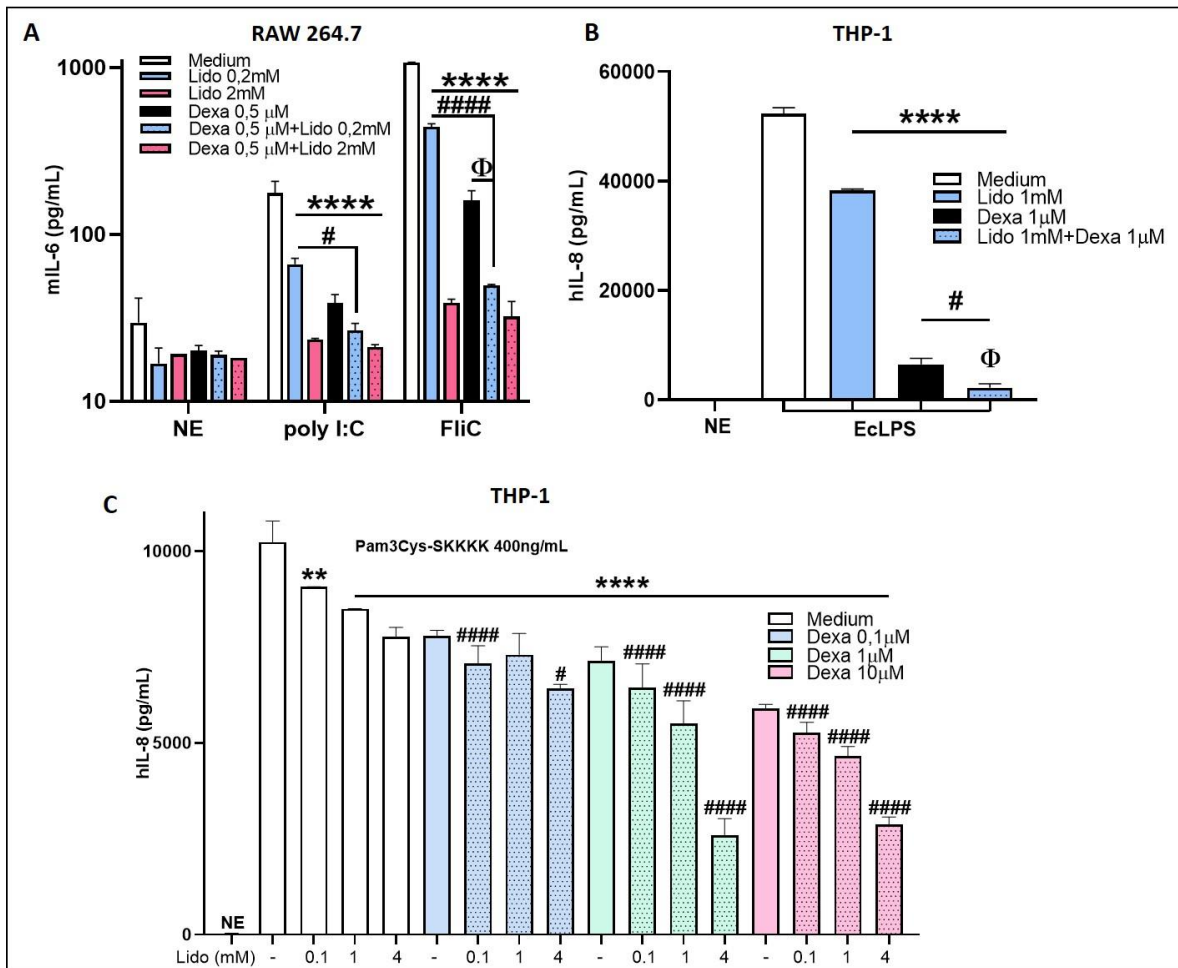


Figura 44. La lidocaína en combinación con la dexametasona tiene un efecto modulador aditivo en las vías de señalización de TLR3, TLR5, TLR4 y TLR2. Las células RAW 264.7 se estimularon con poly I:C y flagelina (FltC), se modularon o no con lidocaína y/o dexametasona, y se midió mL-6 en sobrenadantes de cultivo (A). Las células THP-1 se estimularon con EcLPS (B) y Pam3Cys-SK444 (C) en presencia o no de diferentes concentraciones de lidocaína y/o dexametasona, y se midió hIL-8 en los sobrenadantes. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición estimulada no modulada (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$). # indica un resultado significativamente diferente en comparación con su contraparte estimulado y modulado con solo lidocaína a la misma concentración (# $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ y #### $p \leq 0.0001$). Φ indica un resultado significativamente diferente en comparación a su contraparte estimulada y modulada solo con dexametasona a la misma concentración ($\Phi p \leq 0.01$).

Es de destacar que la señalización por vías de TLR2 y TLR3 han sido identificadas como vías activadas en forma directa por la infección viral en humanos y que la interacción del LPS con la proteína S viral potencia la capacidad de señalización vía TLR4, pudiendo esto contribuir al síndrome inflamatorio asociado a formas severas de la enfermedad⁴⁸⁸⁻⁴⁹². Además, también se ha identificado que la proteína E (Envelope) del virus SARS-COV-2 interactúa con TLR2 (humano y murino) y activa NF- κ B vía Myd88

estimulando citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNF α , IFN γ , IL-1 β ; siendo dicha interacción independiente de la infección viral ⁴⁸⁸.

4.2.2. La lidocaína y la dexametasona son capaces de modular de manera aditiva la señalización inflamatoria por TNFR e IFNGR.

El cuadro inflamatorio que presentan los pacientes de COVID-19 ingresados en UTI se caracterizan por una hipercitoquinemia que puede llevar a la fatalidad de los casos. Dos de las citoquinas que han sido reportadas estar en altos niveles en los pacientes COVID-19 graves son IFN γ y TNF α ⁴⁷⁹. Por ello realizamos estimulaciones con hTNF α sobre células THP1-XBlueTM-MyD88Def en presencia de lidocaína sola y en combinación con dexametasona y medimos secreción de hIL-8 por ELISA en sobrenadante de cultivo.

En la Figura 45A se observa una disminución significativa en la secreción de hIL-8 en todas las condiciones donde alguno de los moduladores estuvo presente, en comparación con la condición estimulada en ausencia de moduladores ($p < 0,05$). La condición de modulación con lidocaína 1mM +

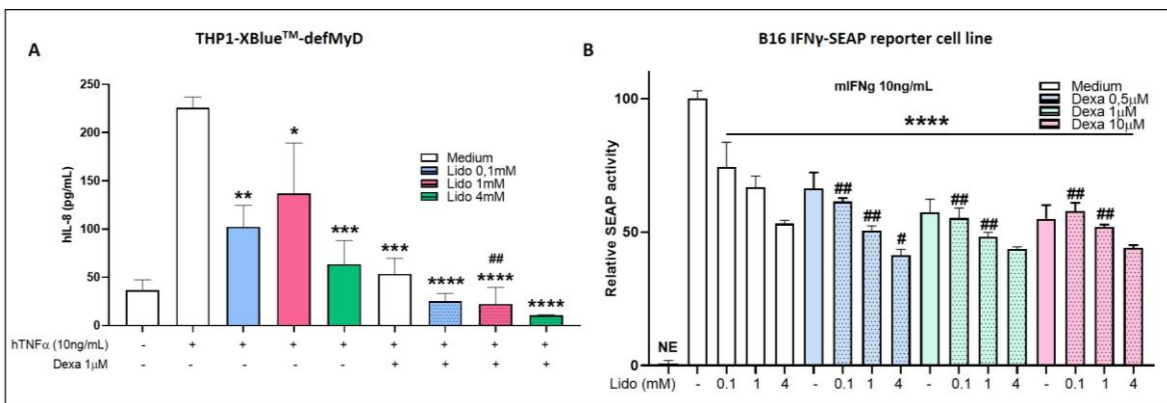


Figura 45. La lidocaína en combinación con la dexametasona tiene un efecto modulador aditivo en la señalización por TNFR e IFNGR. Las células THP1-XBlueTM-defMyD se estimularon con hTNF α y se modularon o no con lidocaína y/o dexametasona y se midió hIL-8 en sobrenadantes de cultivo (A). Se estimularon células B16 reporteras SEAP de IFN γ con mIFN γ (B) en presencia o no de diferentes concentraciones de lidocaína y/o dexametasona y se midió la actividad SEAP en los sobrenadantes. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición estimulada no modulada (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ y **** $p \leq 0,0001$). # indica un resultado significativamente diferente en comparación con su contraparte estimulado y modulado con solo lidocaína a la misma concentración (# $p \leq 0,05$ y ## $p \leq 0,01$).

dexametasona 1 μ M presenta una diferencia significativa en comparación con la modulación con sólo lidocaína 1mM ($p < 0,01$).

Por otro lado, estimulamos con mIFN γ células B16 murinas reporteras SEAP de IFNGR (fosfatasa alcalina secretada) y modulamos con un amplio rango de concentraciones de lidocaína y dexametasona, y en combinaciones de ambas. Medimos actividad SEAP en sobrenadante de cultivo, y nuevamente las medidas muestran que todas las condiciones donde hubo un modulador solo o combinado, presentaron una actividad SEAP significativamente menor comparado con el control estimulado y no modulado (Figura 45B). En este caso también se observa que prácticamente todas las condiciones de combinación de moduladores resultaron en un efecto aditivo en comparación con la modulación de lidocaína sola a la misma concentración.

4.2.3. La lidocaína y la dexametasona son capaces de modular la activación del factor de transcripción NF- κ B.

NF- κ B es un factor de transcripción que, entre otras funciones, controla muchos genes relacionados a la respuesta inmune frente a distintos estímulos pro-inflamatorios como el estrés, citoquinas, antígenos bacterianos o virales, entre otros. Muchos de esos genes controlados por NF- κ B son los de citoquinas pro-inflamatorias como las que presentan los pacientes COVID-19 severos ⁴⁷³.

Para estudiar si la acción de la lidocaína y/o dexametasona puede modular la activación de este factor de transcripción, tratamos distintas líneas celulares humanas reporteras para Nf- κ B: dos epiteliales, Hela (reportera luciferasa) y HEK-hTLR4 (reportera SEAP) y una monocítica-macrofágica THP1-XBlueTM-MyD88Def; las cuales se estimularon con hTNF α , EclPS y hTNF α respectivamente.

Para el caso de HEK-hTLR4 estimuladas con EclPS, observamos que todas las condiciones en las que hay modulador presente se observa una actividad SEAP significativamente menor en comparación al control sin modular ($p < 0,05$). En este ensayo no observamos efecto aditivo de las drogas, aunque se observa una tendencia no significativa para las condiciones de combinación de las mismas en comparación con los tratamientos con sólo lidocaína o sólo dexametasona (Figura 46).

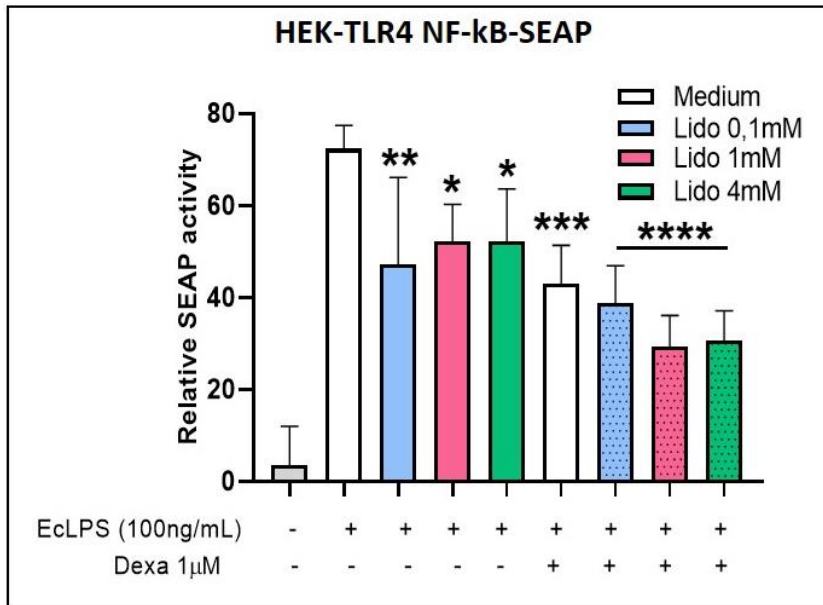


Figura 46. La lidocaína y dexametasona modulan la activación de Nf-κB en la línea reportera HEK-hTLR4-SEAP. Las células HEK-hTLR4 reporteras SEAP se estimularon con EclPS y se modularon o no con lidocaína y/o dexametasona y se midió la actividad relativa de SEAP en sobrenadantes de cultivo. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición estimulada no modulada (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$).

En el caso de THP1-XBlue™-MyD88Def estimuladas con hTNF α , el tratamiento con lidocaína no moduló significativamente la actividad SEAP medida. Sólo en presencia de dexametasona, en combinación con lidocaína o sola, moduló la actividad enzimática (no mostrado). Por otro lado, el ensayo en células HeLa mostró una modulación de la actividad luciferasa con lidocaína a 1 y 4mM, y en todas las condiciones con dexametasona 1μM sola o en combinación. No se evidenció efecto aditivo entre las drogas (no mostrado).

4.2.4. La lidocaína y la dexametasona son capaces de modular de manera aditiva la activación del inflamósoma.

El inflamósoma es una vía que ha sido reportada estar involucrada en la desregulación de la respuesta pro-inflamatoria que presentan los pacientes COVID-19 severos^{493,494}. Células reporteras GFP para ASC, como se ha mencionado con anterioridad en esta tesis, fueron estimuladas con un *prime* de EclPS durante 3hs y luego transfectadas con pcDNA en presencia de lidocaína y dexametasona.

Al microscopio de fluorescencia se pudo observar una disminución en la cantidad de *specks* verdes fluorescentes en comparación con la condición sin modular (Figura 47A). Además, la proporción de células ASC-GFP+/células totales disminuyó significativamente en la condición tratada con lidocaína 0,1mM + dexametasona 1 μ M en comparación con el control sin moduladores ($p < 0,01$, Figura 47B). Estos resultados sinérgicos se confirmaron con la disminución de secreción de hIL-1 β en la condición

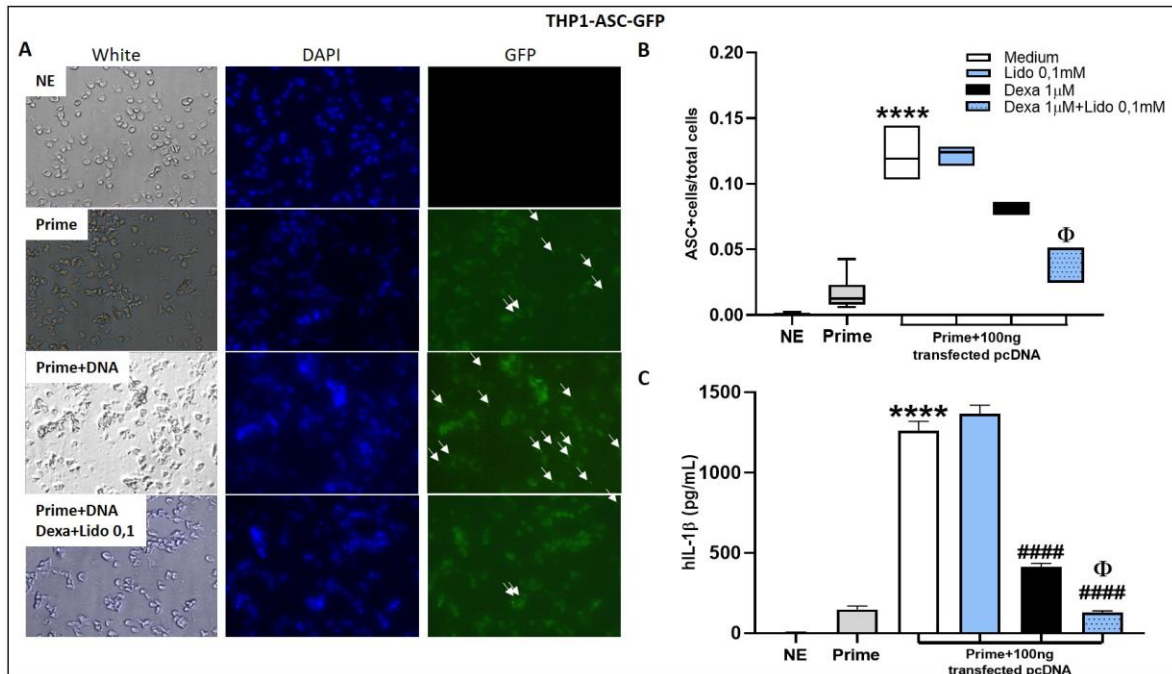


Figura 47. La lidocaína en combinación con la dexametasona tiene un efecto modulador aditivo sobre la vía inflamatoria innata de activación del inflamosoma. Las células THP1-ASC-GFP se estimularon con un prime de EclPS durante tres horas, se transfectaron con pcDNA en presencia o no de lidocaína y/o dexametasona. Las células se prepararon para la observación por microscopía de fluorescencia (A), los *specks* verde intenso y las células se contaron y se calculó la proporción de células ASC+/células totales (B), y se midió hIL-1 β en los sobrenadantes de cultivo (C). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. Las flechas blancas indican los *specks*. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición estimulada no modulada (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ y **** $p \leq 0,0001$). # indica un resultado significativamente diferente en comparación con su contraparte estimulado y modulado con solo lidocaína a la misma concentración (# $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$ y #### $p \leq 0,0001$). Φ indica un resultado significativamente diferente en comparación a su contraparte estimulada y modulada solo con dexametasona a la misma concentración ($\Phi p \leq 0,01$).

con lidocaína 0,1mM + dexametasona 1 μ M, mientras que la lidocaína 0,1mM no ejerció ningún efecto supresor (Figura 47C).

4.2.5. La lidocaína y la dexametasona no son capaces de modular la vía protectora de IFNs de tipo I.

La respuesta de IFNs de tipo I es crucial para controlar infecciones virales, y la causada por el SARS-CoV-2 no es una excepción. Se han reportado las implicancias de una respuesta de IFNs de tipo I tardía o nula y el mal pronóstico del desarrollo de la patología^{495,496}. Para determinar los efectos de la lidocaína en esta vía, utilizamos la línea celular B16 reportera SEAP de IFNs de tipo I.

La estimulación con poly I:C indujo una señal autócrina de IFN α/β que da como resultado una alta actividad de SEAP, la cual disminuyó drásticamente cuando tratamos el poly I:C con RNasa previamente a la estimulación (Figura 48A). El tratamiento con lidocaína y dexametasona por separado o en combinación disminuyó significativamente la actividad de SEAP en comparación con el control no modulado. Esta modulación es vía TLR3 y no a través de IFNAR, ya que en el mismo ensayo realizado

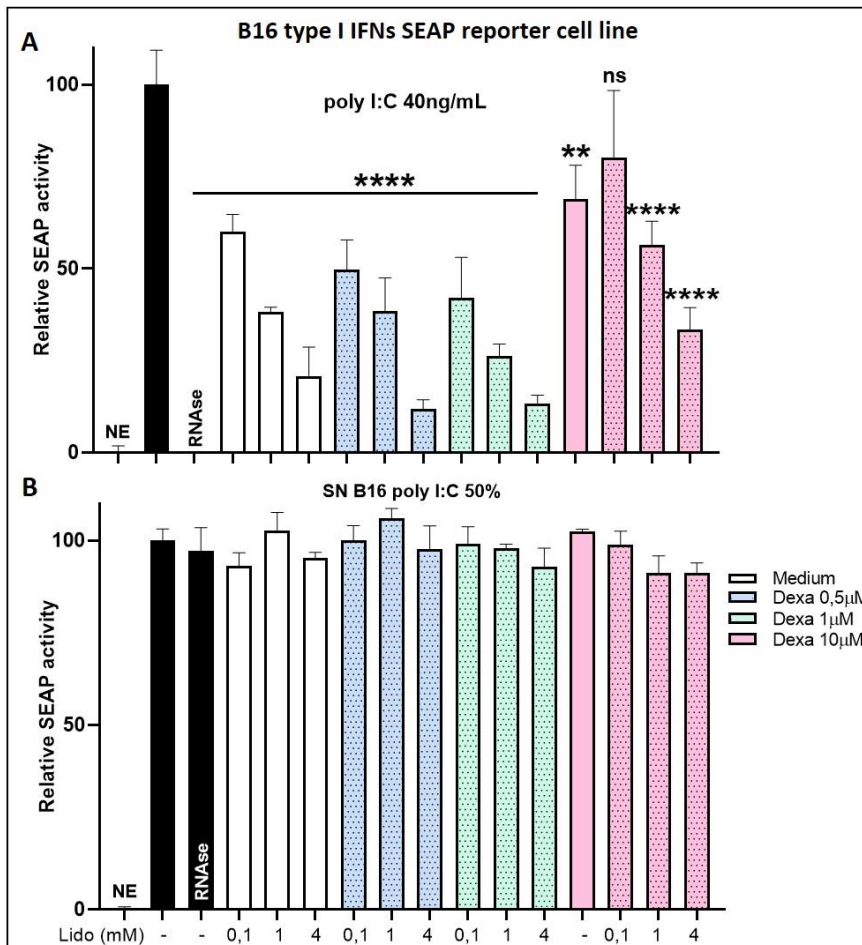


Figura 48. La lidocaína y dexametasona modulan la señalización vía TLR3 de poly I:C, pero no afectan la señalización vía IFNAR. Células B16 reporteras SEAP de IFNs de tipo I fueron estimuladas con poly I:C (A) o con sobrenadante de la misma línea celular previamente estimulada con poly I:C (B), y moduladas o no con Lidocaína y/o Dexametasona. La actividad de SEAP se midió en sobrenadantes de cultivo. Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición estimulada no modulada (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ y **** $p \leq 0.0001$).

con sobrenadante de células B16 previamente estimuladas con poly I:C (como fuente de IFNs de tipo I), no se observó modulación (Figura 48B). En este caso, el pretratamiento del sobrenadante con RNasa no alteró la señal de actividad enzimática, lo que indica que la estimulación se da efectivamente por IFNs de tipo I y no por remanentes de poly I:C utilizado en el ensayo anterior.

4.2.6. La lidocaína y la dexametasona son capaces de modular de manera aditiva la respuesta inflamatoria exacerbada en un contexto de infección *in vitro* por SARS-CoV-2.

Con el objetivo de evaluar el efecto de estos moduladores en un contexto de interacción hospedador-patógeno con el SARS-CoV-2, se expusieron células THP-1 al virus a una MOI de 0,25 en presencia de EclPS. Se ha informado que la línea THP-1 no es sensible a la infección debido a la baja o nula expresión del receptor ACE2. Sin embargo, en estas condiciones, el SARS-CoV-2 exagera la interacción y señalización inflamatoria del LPS en las células THP-1 ^{491,492}.

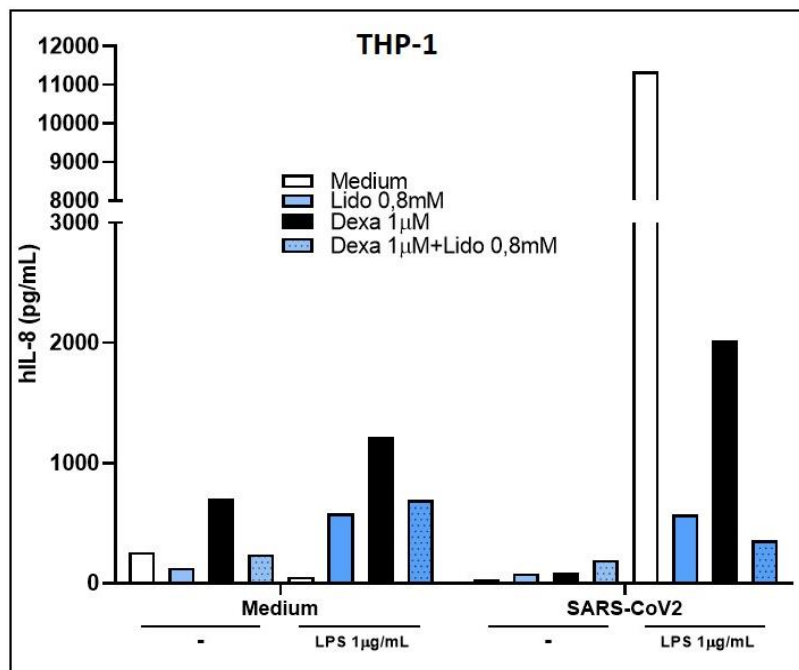


Figura 49. La combinación de lidocaína y dexametasona modulan la secreción de la citoquina inflamatoria hIL-8 inducida por el tratamiento de EclPS y el virus SARS-CoV-2 sobre células THP-1. Esta combinación modula el efecto inflamatorio producido directamente por el SARS-CoV-2 en células humanas. Debido al diseño del ensayo no es posible realizar un análisis estadístico a estas medidas.

Observamos que los niveles de hIL-8 aumentan en el sobrenadante de cultivo de las células tratadas con el virus y ECLPS, y que tanto los moduladores por separado o en combinación indujeron una disminución en la secreción de la citoquina (Figura 49). Estos hallazgos indican que la combinación de fármacos supresores moduló la secreción de hIL-8 inducida por el SARS-CoV-2 en células relevantes en la respuesta inflamatoria sistémica.

Posteriormente, evaluamos el efecto del tratamiento con lidocaína en la activación pro-inflamatoria inducida por la infección viral en células epiteliales. La línea celular epitelial Calu-3 proveniente de vías respiratorias y que es sensible a la infección viral^{497,498}, fue infectada a una MOI de 1. La expresión génica se evaluó mediante RT-qPCR 16 hs después de la infección. En la Figura 50 se observa que se incrementó la expresión de diferentes genes pro-inflamatorios (CXCL10, CCL20, CXCL2) tras la infección viral en comparación con la condición no infectada ($p < 0,01$). La expresión de CXCL10 y CCL20 fue significativamente menor en las condiciones de tratamiento con lidocaína sola o en combinación con dexametasona. La expresión de CXCL2 presentó una menor expresión no significativa en las condiciones moduladas con lidocaína y/o dexametasona. Por otro lado, los genes antivirales como Mx-1 fueron inducidos por la infección viral y no fueron modulados por lidocaína/dexametasona, lo que posiblemente refleja una señalización diferencial que controla los distintos tipos de genes. Los ensayos de infección presentados en las Figuras 49 y 50 se realizaron en el INBIRS-UBA.

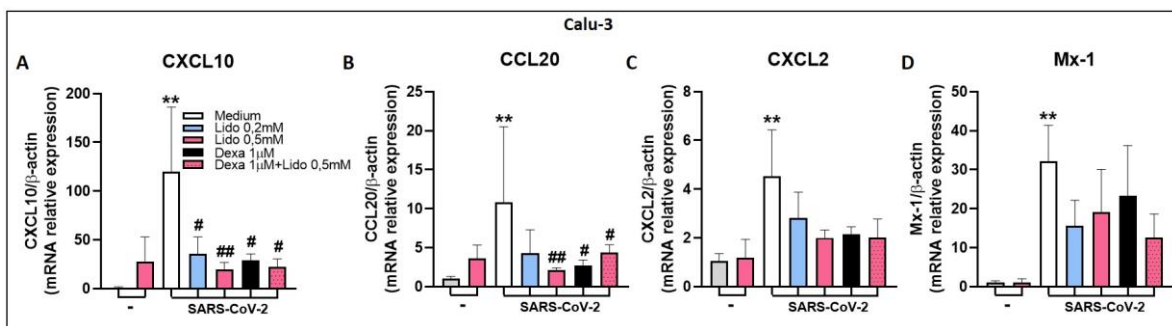


Figura 50. La lidocaína y dexametasona modulan la expresión de genes pro-inflamatorios en células epiteliales infectadas por SARS-CoV-2. Células Calu-3 fueron infectadas con la cepa tipo Wuhan del virus SARS-CoV-2 a una MOI de 1, y moduladas o no con Lidocaína y/o Dexametasona. Se midieron los niveles de expresión de ARNm de CXCL10 (A), CCL20 (B), CXCL2 (C) y Mx-1 (D). Las distintas condiciones experimentales se llevaron a cabo por triplicado; se grafica la media con su desviación estándar (SD). Gráficos representativos de al menos 2 experimentos independientes. * indica un resultado significativamente diferente en comparación a la condición no infectada (-) ($*p \leq 0.05$ y $**p \leq 0.01$). # indica un resultado significativamente diferente en comparación con la condición estimulada no modulada ($\#p \leq 0.05$ y $\#\#p \leq 0.01$).

Con el objetivo de probar si existe alguna interacción entre la lidocaína y la replicación viral, se realizó un ensayo de inhibición de la replicación del virus SARS-CoV-2 en células Vero. Previamente, se

realizó un ensayo de citotoxicidad en éstas células utilizando dosis in crescendo de lidocaína de 0,1 a 3mM. Se observó que la dosis máxima que no produjo efecto citotóxico sobre las células Vero fue la de 1mM. Entonces, se infectaron monocapas de células Vero pre-tratadas con lidocaína 1mM y luego infectadas con SARS-CoV-2 o se realizaron las infecciones en presencia de la droga a 1mM. En ninguno de los casos se observó efecto inhibitorio de la replicación viral (no mostrado. Ensayos realizados en el Instituto Malbrán).

Discusión

Fuimos capaces de generar, producir y purificar cuatro clones productores de anticuerpos monoclonales anti-proteínas N y RBD del virus SARS-CoV-2. Ambas especificidades de los anticuerpos pueden ser utilizadas en reemplazo de los sueros humanos infectados y/o vacunados como control positivo de la técnica de inmunofluorescencia indirecta sobre improntas de células infectadas que se utiliza, entre otros métodos, como control de la capacidad infectiva de cepas de SARS-CoV-2. Uno de los clones productores de anticuerpos anti-N está siendo utilizado en el desarrollo de un test diagnóstico rápido de antígeno en colaboración con el grupo del Dr. Cavalitto del CINDEFI-UNLP. Además, se está evaluando la posibilidad de agregar la detección del antígeno N del SARS-CoV-2 con nuestro monoclonal, a un kit de *screening* de variados virus respiratorios que se usa actualmente en hospitales públicos.

Uno de los clones productores de anticuerpos monoclonales anti-RBD presentó una fuerte capacidad neutralizante mientras el anti-N, como era de esperarse, no presentó dicha capacidad. No solo porque el modelo *in vitro* de pseudovirus las células HEK293T se transfectan sólo con el gen de la proteína S, sino porque además la proteína N se encuentra en el interior de la estructura viral⁴⁹⁹. De un anticuerpo neutralizante se espera que bloquee la interacción de una proteína viral con el receptor⁵⁰⁰ del hospedador, como la proteína N no es responsable de la interacción y/o entrada del virus SARS-CoV-2 a la célula hospedadora, no se espera que sea un target de neutralización. Si bien el monoclonal anti-RBD podría ser prometedor como terapia para pacientes COVID-19, son varias las limitaciones que presenta. Por un lado, que todos los anticuerpos generados son murinos y las tecnologías para humanizarlo y evitar así las problemáticas de rechazo, no están a nuestro alcance. Segundo, que el momento de la administración de drogas que actúan como neutralizantes evitando la entrada del patógeno, es crucial y sumado al alto costo de las mismas, hacen que la intervención no sea asequible al menos de manera masiva para la población⁵⁰¹. Por otro lado, el virus SARS-CoV-2 presenta una alta tasa de mutación, en particular en la proteína S que es responsable de la entrada del virus a la célula hospedadora y de la fusión de membranas para que el ARN viral acceda al citoplasma. Se ha demostrado que varias de las mutaciones en la proteína S que han surgido en el transcurso de la pandemia impactan negativamente en la capacidad neutralizante del plasma de pacientes convalecientes y anticuerpos monoclonales, explicando así la pérdida de eficacia de estos tratamientos

en la clínica ^{502,503}. Esto no inhabilita los grandes potenciales que tienen ambos anticuerpos monoclonales generados para el estudio básico de la biología de este virus y la patología que causa.

En cuanto a la evaluación de la capacidad de la lidocaína de modular una respuesta inflamatoria *in vitro*, hemos llegado a una primera caracterización positiva de la misma, tanto sola como en combinación con dexametasona.

Las múltiples oleadas de casos de COVID-19 que han afectado a diferentes regiones del mundo han mostrado una variada heterogeneidad en las consecuencias clínicas con una baja proporción de casos graves que se asociaron principalmente a la longevidad y presencia de comorbilidades ⁵⁰⁴. En particular, la mortalidad reportada en pacientes con COVID-19 en UTI es de un promedio del 30% dependiendo de diferentes factores ⁵⁰⁵. Si bien la vacunación ha impactado en la severidad y mortalidad de la enfermedad, ocasionalmente con las nuevas variantes virales todavía hay casos severos en la población vacunada, en su mayoría asociados a la longevidad y/o comorbilidades, o a una respuesta inmune alterada a las vacunas ⁵⁰⁶. Esta situación sumada a la preocupante cantidad creciente de movimientos antivacunas, demanda mejorar las opciones de tratamiento para manejar los casos graves de COVID-19.

Los tratamientos disponibles se centran en la eliminación del virus, como el uso de anticuerpos monoclonales específicos o en drogas antivirales. Por otro lado, el uso de medicamentos anti-inflamatorios ayuda a evitar complicaciones graves debido a una respuesta inmune desregulada asociada a la fase IIb y III en pacientes graves con COVID-19 ⁵⁰⁷. En relación a este último tipo de tratamiento, se ha demostrado que el uso de dexametasona u otros corticosteroides que modulan la respuesta inmune inflamatoria sistémica, reduce la mortalidad y la duración de la estadía en la UTI ⁴⁶⁸ y se ha adoptado en todo el mundo. Aun así, el momento y la dosificación óptimos de este tratamiento son objeto de investigación clínica ⁵⁰⁸⁻⁵¹⁰.

A pesar de los beneficios del uso de corticosteroides para tratar pacientes hospitalizados con COVID-19, aún se observa una alta mortalidad en las UTIs y se espera que surjan herramientas adicionales para manejar estos pacientes, por lo que se están realizando importantes esfuerzos para mejorar los tratamientos anti-inflamatorios ⁵¹¹. En este tiempo, aprendimos que la llamada tormenta de citoquinas en pacientes con COVID-19 consiste en un *loop* inflamatorio autosostenido desencadenado por la infección viral pero que involucra varios actores del hospedador, como células endoteliales, neutrófilos, macrófagos, plaquetas, linfocitos y células epiteliales que contribuyen en

diferentes tiempos con distintas citoquinas y mediadores inflamatorios ⁵¹². Esta interacción compleja crea un escenario desafiante para desarticular la situación si se plantea apuntar sólo a una citoquina o receptor, ya que el momento de las intervenciones se vuelve más crítico cuando se usan targets individuales ⁵¹³. En este contexto, los resultados que mostramos en este Capítulo relacionados con la modulación de manera dosis dependiente de la activación del inflamosoma y de distintas vías de señalización TLR por parte de la lidocaína y de forma aditiva con la dexametasona indican que esta podría ser una combinación prometedora. Se ha informado una señalización intensificada de TLR4 por interacción con proteínas virales del SARS-CoV-2 y también la señalización por TLR2, TLR3 y TLR7 es desencadenada por ligandos derivados del virus durante la infección ^{488,514}. Además, las co-infecciones o la translocación bacteriana pueden contribuir a una amplificación de las vías inflamatorias mediada por TLR ⁵¹⁵. Aunque se sabe que la lidocaína inhibe estas vías ⁵¹⁶, hasta el momento no se ha demostrado la interacción con la dexametasona.

Por otro lado, hemos demostrado que la lidocaína puede modular la activación de monocitos macrófagos estimulados con TNF α , una citoquina que ha demostrado ser actor importante en la tormenta de citoquinas de los casos severos de COVID-19 ⁵¹². La combinación de lidocaína/dexametasona también tuvo un efecto aditivo en la modulación de la señalización de IFNGR. Si bien esta citoquina no está elevada en pacientes que no han desarrollado enfermedad respiratoria aguda, en fases posteriores puede contribuir al daño tisular siendo parte del eje inmunopatológico de la COVID-19 grave ⁵¹⁷.

Curiosamente, el tratamiento con lidocaína no afectó la señalización de IFNs de tipo I en las células hospedadoras, siendo que esta vía es crítica en la contención de la infección viral ^{518,519}, por lo que las intervenciones que puedan afectar su función podrían aumentar el riesgo clínico, especialmente si se aplican en las primeras fases de la infección ⁵²⁰. Nuestros resultados indican que este no sería el caso del tratamiento con lidocaína.

Con los resultados obtenidos mostramos que la lidocaína modula la respuesta inflamatoria causada por la pseudoinfección viral (en células THP-1) o infección viral (en células Calu-3) con la cepa tipo Wuhan del SARS-CoV-2. Como se mencionó anteriormente, en muchas enfermedades, incluida la COVID-19 severa, la fisiopatogenia es promovida por una respuesta inmune desregulada del hospedador más que por la infección viral en sí ⁵¹². Por lo tanto, la disminución de la secreción de hIL-8 y de la expresión génica de diferentes genes pro-inflamatorios son resultados alentadores para tratar

de controlar la respuesta inmune desproporcionada observada en pacientes graves con COVID-19 de las UTIs.

Aunque se ha previsto el uso de lidocaína para modular la inflamación en pacientes graves con COVID-19 ⁵²¹, hasta ahora ha habido pocos intentos concretos. Se publicó recientemente (la publicación es de diciembre 2021, el caso que reporta fue tratado en junio de 2020) el caso de un paciente grave que recibió por vía i.v. una infusión de lidocaína ⁵²², lo que indica una buena respuesta al tratamiento y la ausencia de eventos adversos. En noviembre de 2020 se inició en Francia un trial clínico para probar el efecto de la administración i.v. de lidocaína en pacientes COVID-19 y con síndrome de dificultad respiratoria e inflamación no COVID-19 (NCT04609865) ⁵²³. El régimen de dosificación podría ser fundamental para determinar la eficacia clínica de la intervención ya que la lidocaína puede modular diferentes vías de señalización relacionadas con la inflamación en concentraciones del rango de 10 a 200 μM , superponiéndose parcialmente con las concentraciones probadas en nuestros experimentos, sin embargo, las concentraciones en sangre superiores a 20 μM comienzan a tener efectos secundarios no deseados ⁵¹⁶. Un enfoque diferente ha sido propuesto por Hasan et al. ⁵²⁴, que reportaron una serie de casos de COVID-19 tratados con lidocaína administrada por vía subdérmica a una velocidad de infusión continua de 1mg/kg/h durante 6 días. De esta manera, las concentraciones plasmáticas permanecen por debajo del umbral de seguridad y los autores argumentan que concentraciones más altas en los sistemas de drenaje linfáticos permiten una mayor exposición de las células inmunitarias al fármaco para aumentar sus efectos inmunomoduladores. Los autores informan una serie de 20 casos graves de COVID-19 tratados con este régimen de dosificación donde 19 de ellos se recuperaron con éxito de la enfermedad.

Estas vías de administración alternativas y el efecto combinado con los corticosteroides aquí informados pueden contribuir a mejorar y ampliar las opciones disponibles hasta el momento para manejar a los pacientes con COVID-19 severa.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

“Cuando se acerca el fin, escribió Cartaphilus, ya no quedan imágenes del recuerdo; solo quedan palabras. Palabras, palabras desplazadas y mutiladas, palabras de otros, fue la pobre limosna que le dejaron las horas y los siglos”

J. L. Borges

Esta tesis se enfocó en el desarrollo de nuevas herramientas inmunológicas para el diagnóstico y estudio de procesos biológicos, en la consolidación y profundización de conocimientos sobre un nuevo candidato vacunal contra la enfermedad re-emergente pertussis y, en el último tiempo, en el aporte experimental y de conocimiento para posibles soluciones frente a la enfermedad emergente COVID-19.

La interacción entre la ciencia y la política ha mostrado en más de una oportunidad que es el camino que permite llegar a soluciones robustas y efectivas a problemas complejos como lo es la salud pública. La pandemia causada por el SARS-CoV-2 fue y es un ejemplo de ello. Como científica comparto la idea de que el aporte racional de conocimiento en áreas de investigación biomédica viabiliza la posibilidad de mejoras en la toma de decisiones. La emergencia y resurgencia de enfermedades de impacto, como las estudiadas en esta tesis, nos llama a un trabajo conjunto ya que se trata de una problemática compleja donde se entrelazan dimensiones sociales, económicas, políticas, y en ellas, el principal actor es el comportamiento humano.

El crecimiento de la población, el hacinamiento y la migración de personas contribuyen a crear nuevos nichos ecológicos propicios para que re/surjan enfermedades ^{525,526}. Un estudio sobre cambio climático y la aparición del SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2 sugiere que el número de coronavirus presentes en un área se correlaciona fuertemente con la diversidad de especies de murciélagos locales, que a su vez se ve afectada por las condiciones climáticas que impulsan la distribución geográfica de especies ⁵²⁷.

Por otro lado, tres de los principales impulsores del resurgimiento y/o agravamiento de enfermedades infecciosas son la pobreza, la desigualdad social y la inequidad en el acceso a la salud ^{528,529}. Dichas desigualdades juegan un papel importante en la propagación de enfermedades re/emergentes. Un estudio en Estados Unidos mostró que la gran mayoría de las víctimas por COVID-19 provenían de áreas con las tasas más altas de factores de riesgo sociodemográficos, de bajos ingresos y con altos porcentajes de residentes no blancos ⁵³⁰. Es claro, entonces, que además de contar con sistemas de vigilancia, técnicas de diagnóstico, vacunas y tratamientos efectivos, se requiere que estos servicios e insumos con características de bien público sean accesibles para toda la sociedad de manera equitativa e inmediata.

Es por ello que los que nos formamos y trabajamos en el área de salud debemos hacerlo de manera íntegra, esto es, con capacidad de realizar trabajos conjuntos en la inter y transdisciplina. En

este contexto, en el presente trabajo de tesis abordamos aspectos básicos y aplicados de temas de salud de impacto. En particular, avanzamos en el conocimiento sobre la respuesta inmune montada por la inmunización contra pertussis, una enfermedad resurgente. Pudimos evidenciar claramente la característica de redundancia de la respuesta montada por la vacunación empleando el modelo murino de protección con *B. pertussis*. Pudimos manifestar esta característica con las distintas vacunas comerciales (wP y aP) en uso y con nuestro candidato vacunal, las BpOMVs derivadas del agente causal *B. pertussis*. En el intento de caracterizar el aporte y la relevancia específica de las distintas poblaciones celulares, se pusieron de manifiesto las limitaciones de los modelos experimentales desarrollados basadas fundamentalmente en estrategias de depleción de poblaciones. El modelo murino de protección anti-*B. pertussis* es el modelo animal más ampliamente usado en el estudio de la enfermedad pertussis, aun cuando es bien conocido que esta bacteria no es huésped natural en ratones. Este modelo es limitado ya que la sintomatología y transmisión de la enfermedad no es análoga a la patología en humanos. Aún así, ha sido y es de gran utilidad en el análisis de la respuesta inmunológica tanto para la infección natural como para la vacunación⁵³¹⁻⁵³³. Nuestros resultados concuerdan con el conocimiento sobre el rol de determinadas poblaciones linfocitarias relevantes en mecanismos de protección antipertussis. Las mismas pudieron evidenciarse cuando la depleción incluyó la vía i.n. La eliminación sistémica de una significativa proporción de linfocitos sistémicos con anticuerpos monoclonales depletantes y por remoción del bazo no impactó en la protección frente al desafío con *B. pertussis*. Esto nos llevó a pensar que las poblaciones linfocitarias de memoria residentes de pulmón serían suficientes y responsables de la protección pulmonar. Muchos son los interrogantes que surgen de estos resultados, entre ellos, los mecanismos por los cuales la vacuna a BpOMVs genera el *homing* de las poblaciones linfocitarias a pulmón y la correlación de estos mecanismos y montaje de la respuesta inmune en humanos. Si bien esto requiere de más experimentaciones que están planeada para el futuro, nuestros resultados permitieron evidenciar que nuestro candidato vacunal es capaz de generar una población linfocitaria local protectora contra la infección por *B. pertussis* en el modelo murino, y que la respuesta sistémica de linfocitos CD4, CD8 y B220 sería dispensable en dicha protección. De todas formas, se deberían incorporar otros marcadores de poblaciones celulares para determinar diferentes *subsets* de linfocitos que podrían estar contribuyendo de manera diferencial a la protección antipertussis.

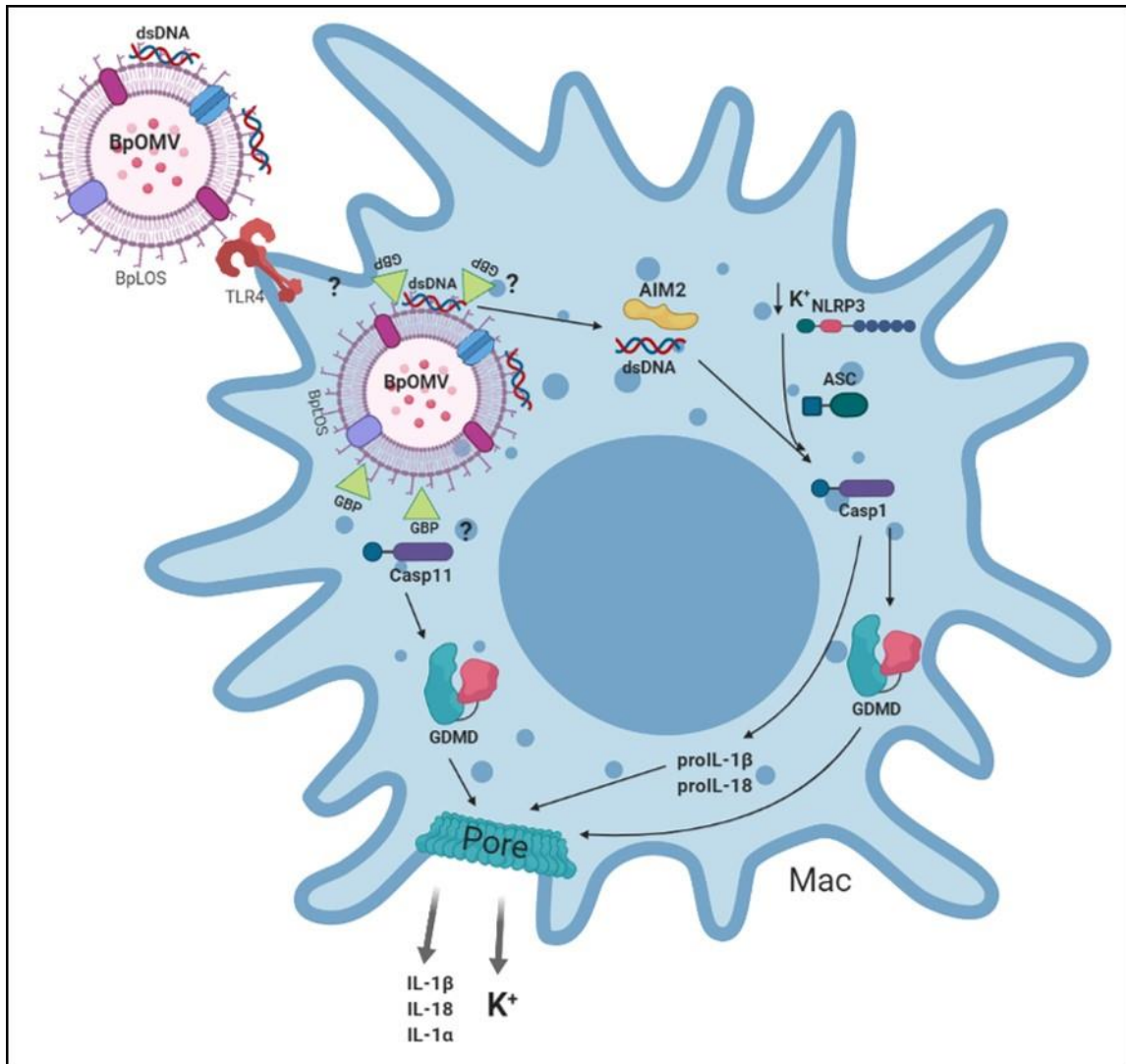
Un aspecto novel que abordamos en esta tesis fue el análisis de la activación del inflamósoma por parte de nuestro candidato vacunal, ya que es un mecanismo clave en la orquestación de la

respuesta inmune adaptativa^{435,534}. Las experimentaciones realizadas mostraron de manera robusta la capacidad de las BpOMVs de activar la vía del inflamósoma de manera dependiente de NLRP3, Caspasa-1, Caspasa-11 y Gadermina-D, y parcialmente dependiente de AIM2 y del flujo de iones potasio. A su vez, evidenciamos que uno de los factores presentes en las BpOMVs que desencadenan dicha activación es el BpLOS. Más aún, pudimos detectar que el rol de BpOMVs en la activación del inflamósoma es dependiente del grado de acilación de dicha molécula. Otro actor en la activación del inflamósoma que pudimos identificar fue ADN doble hebra asociado a las BpOMVs. Pudimos evidenciar que el acceso y sensado intracitosólico del BpLOS y del ADN asociado a las BpOMVs en macrófagos murinos se da como consecuencia de la internalización de las mismas. Es sabido que las OMVs pueden ingresar a la célula hospedadora a través de diversos mecanismos⁴¹⁰ dependiendo de varios factores como las cepas bacterianas, los tipos de células hospedadoras, las líneas celulares utilizadas, el tamaño de las OMVs, su contenido proteico y su composición⁵³⁵. En este trabajo y por primera vez, hemos evidenciado que las BpOMVs son internalizadas de manera activa por la célula hospedadora ya que el tratamiento con Citocalasina-D o la incubación a 4°C afectaron la internalización.

Por otro lado, nuestros resultados pueden sostener la idea de que el sensado intracitosólico tanto del BpLOS como del ADN asociados a las BpOMVs requiere de las proteínas GBPs^{368,369,382,386,433}, cuya expresión resultó ser inducida por las mismas BpOMVs. Estas GBPs podrían estar involucradas tanto en la ruptura como en el *leakage* o filtrado de PAMPs de los endosomas que contienen las BpOMVs, como así también ser intermediarias entre los ligandos y sus receptores citosólicos.

Todos estos hallazgos que evidencian y caracterizan la capacidad de las BpOMVs para activar diferentes vías del inflamósoma indican que esta activación es uno de los mecanismos por los cuales nuestro candidato vacunal perfila o condiciona la respuesta inmune provocada por la vacunación. De manera resumida, nuestros hallazgos permiten describir que esta activación está mediada por el BpLOS y el ADN de las BpOMVs los cuales son detectados, en colaboración con las GBPs del cromosoma 3, por Caspasa-11 y AIM2 respectivamente. Estos eventos conducen al procesamiento de GSDMD y a la formación de poros en la membrana plasmática. Esta permeabilización de la membrana permite la salida de iones K⁺ y consecuentemente, la disminución de la concentración intracelular de estos iones es detectada por NLRP3 causando su oligomerización con el adaptador ASC. Finalmente, se activa la Caspasa-1, que a su vez escinde pro-IL-1 β , por-IL-18 y más GSDMD, lo que desencadena la secreción de IL-1 β , IL-18 y un nuevo circuito de retroalimentación. Todo este proceso está esquematizado en la Representación 16 realizada para este trabajo.

Así, las BpOMVs desencadenan una vía central de activación de la respuesta inmune innata, la cual podría ser uno de los mecanismos responsables en sesgar el perfil del sistema inmunológico adaptativo protector en respuesta a la vacunación con BpOMVs en el modelo murino.



Representación 16. Esquema representativo de la activación del inflamosoma por las BpOMVs. Created with BioRender.com

Respecto del desarrollo de herramientas, durante el transcurso de esta tesis hemos logrado la generación exitosa de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-GroEL de *B. pertussis*, anti-RBD y anti-N del virus SARS-CoV-2, su producción en líquido ascítico y la purificación de los mismos. No pudimos evidenciar que los anticuerpos monoclonales anti-GroEL, en las condiciones ensayadas,

tengan un rol en la protección contra *B. pertussis*. Estos anticuerpos desnudos o conjugados al fluorocromo AF647 permitieron avanzar en desarrollos de distintas técnicas inmunoquímicas como aglutinación, ELISA, inmunoblotting y tracking intracelular por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Respecto de los anticuerpos monoclonales anti-RBD y anti-N pudimos desarrollar con éxito su empleo en la técnica de inmunofluorescencia indirecta de células infectadas con SARS-CoV-2, método que se utiliza como control de la capacidad infectiva de cepas de SARS-CoV-2 y como control de lote productivo en el Instituto Malbrán. Además, el anticuerpo monoclonal anti-RBD presentó una alta capacidad neutralizante en un modelo *in vitro* de infección con pseudovirus lo que abre las perspectivas de una posible aplicación terapéutica; y el clon productor de anticuerpos anti-N ya forma parte de un kit diagnóstico rápido de tiras reactivas por detección de antígeno en vías de desarrollo.

Describimos también la capacidad anti-inflamatoria de la lidocaína y sus efectos aditivos a los de la dexametasona como posible tratamiento modulador de la respuesta inflamatoria exacerbada que presentan los pacientes COVID-19 severos. En todas las líneas celulares utilizadas, que fueron pre-tratadas con lidocaína y dexametasona en presencia de estímulos activadores pro-inflamatorios por ligandos TLR, citoquinas inflamatorias y el mismo virus SARS-CoV-2, se observó que ambos tratamientos modularon la secreción de citoquinas (IL-6, IL-8, IL-1 β) y la expresión de genes (CXCL10, CCL20, CXCL2) inflamatorios. Se pudo corroborar que la lidocaína actúa al menos sobre dos vías centrales de amplificación de fenómenos inflamatorios como son la vía de NF-kB y la del inflamósoma. Finalmente, confirmamos que la lidocaína no afecta la señalización de la vía de los interferones de tipo I, al menos en el modelo *in vitro* ensayado. Esto resulta promisorio teniendo en cuenta que una buena respuesta de interferones tipo I ha sido asociada a la contención de la replicación viral del SARS-CoV-2⁵³⁶. El hecho que la lidocaína no interfiera en esta vía, despeja el riesgo potencial de una intervención en pacientes que resulte en detrimento del montado de una respuesta anti-viral adecuada.

En suma, podemos concluir que hemos podido generar anticuerpos monoclonales anti SARS-CoV-2 con variadas potenciales aplicaciones en diagnóstico, terapéutica y estudio de la biología de este patógeno emergente. Además, demostramos la factibilidad del reposicionamiento de la lidocaína, en combinación con la dexametasona, como tratamiento anti-inflamatorio para la COVID-19.

Antes de finalizar esta sección quiero resaltar un aspecto importante que es que durante estos años he transitado una diversidad de abordajes y técnicas que han permitido formarme académica y

experimentalmente en el área de la inmunología básica, la vacunología y del ser humano. Atravesar todo ello me ha permitido madurar en cuanto pensamiento crítico y capacidad de desarrollar y racionalizar diseños experimentales. Con la concreción de esta tesis logramos alcanzar resultados y aportar nuevos conocimientos capaces de encaminar posibles soluciones a problemáticas de salud que hoy en día se consideran de gravedad y urgencia, como lo son pertussis y la COVID-19.

ABREVIATURAS

ACT: Toxina adenilato ciclasa de *B. pertussis*

Bb: *Bordetella bronchiseptica*.

BMDM: Macrófagos derivados de médula ósea (Bone Marrow Derived Macrophages)

Bp: *Bordetella pertussis*

Bp1624: aislamiento argentino de *Bordetella pertussis*

BpDNA: ADN cromosomal de *Bordetella pertussis*.

BpLOS: Lipooligosacárido de *Bordetella pertussis*.

BpOMV: Formulación vacunal 3ug de proteínas totales de BpOMVs con los componentes tetánico y diftérico y Al(OH)₃ como adyuvante (de manera análoga a las formulaciones de las vacunas comerciales)

BpOMVs: Vesículas de membrana externa de *Bordetella pertussis*

Bpp: *Bordetella parapertussis*

BppLPS: Lipopolisacárido de *Bordetella parapertussis*.

BppOMVs: Vesículas de membrana externa de *Bordetella parapertussis* ATCC.

BpTOH: Bp TOHAMA: cepa de referencia de *Bordetella pertussis*

BSA: Seroalbúmina bovina

Cito-D: Citocalasina-D

DMEM: medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium

Ec: *Escherichia coli*

EcLPS: Lipopolisacárido de *Escherichia coli*

FACS: buffer PBS-2%SFB (Natocor)

FAL: Buffer Fosfatasa alcalina (Dietanolamina (DEA) 1mM, Cloruro de magnesio 0,5mM, pH 10,4)

FliC: Flagelina

GFP: Proteína Verde Fluorescente

GSDMD: Gasdermina D

HAT: hypoxanthine-aminopterin-thymidine. Medio de cultivo selectivo de hibridomas.

HKBp: suspensión de bacterias BpTOH muertas por calor (Heat Killed Bp)

HKEc: suspensión de bacterias E. coli S17-1 muertas por calor (Heat Killed Ec)

HRP: Peroxidasa de rabanito

i.n.: vía de inoculación intranasal

i.p.: vía de inoculación intraperitoneal

KCl: Cloruro de potasio

LOS: Lipooligosacárido

LPS: Lipopolisacárido

N: proteína de la Nucleocápside del virus SARS-CoV-2

ON: Over Night (durante una noche)

OPD: Ortofenildiamina

Pa: *Pseudomonas aeruginosa*

Pam3Cys-SK: N-Palmitoyl-S- [2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cysteinyl-(S)-seryl-(S)-lysyl-(S)-lysyl-(S)-lysyl-(S)-lysine x 3HCl (agonista TLR2)

PBS: Buffer fosfato (KH₂PO₄ 0,428g/L, Na₂HPO₄ 1,39g/L, NaCl 7,2g/L pH 7,4)

pcDNA: ADN plasmídico bacteriano

PEG: Polietilenglicol

PFA: Paraformaldheído

PNPP: Para-nitrofenilfosfato

polyI:C: Polyinosinic:polycytidylic acid (ácido Polinosínico:policitidílico)

PS: Penicilina estreptomina (Penicillin Streptomycin)

PT: Toxina pertussis

RBD: Dominio de unión del receptor de la proteína S del virus SARS-CoV-2

rGroEL: proteína GroEL recombinante

RPMI: medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

s.c.: vía de inoculación subcutánea

S: proteína Spike (espiga) del virus SARS-CoV-2

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

SFB: Suero Fetal Bovino

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 1

○ CULTIVOS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

• CULTIVO DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DEPLETANTES

Los clones GK1.5: rata anti ratón CD4, 53.6.72: rata anti ratón CD8 α y RA3-6B2: rata anti ratón CD45R/B220 se mantuvieron en medio de cultivo DMEM-10%SFB (Gibco), 100U/mL de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, hasta tener cantidades suficientes de células para inocular ratones Nude y producir líquido ascítico (ver más adelante).

• CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE BAZO PARA ENSAYO DE RESPUESTA CELULAR

Los bazos disecados de ratones inmunizados fueron disgregados con cell strainers BD[®] (70 μ m) y sembrados a razón de 4x10⁶ células/fosa en placa de 48 fosas con medio de cultivo RPMI-10%SFB (Gibco) y estimuladas con HKBp o BpOMVs. Los sobrenadantes fueron colectados luego de 72hs y las citoquinas mIFN γ , mL-17A y mL-5 medidas por ELISA (BD[®]) según indicaciones del fabricante.

○ DECLARACIONES ÉTICAS

En Argentina:

- El protocolo de inmunización e infección intranasal con *B. pertussis* fue aprobado por el CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de animales de laboratorio) (N° Protocolo 003-06-15) de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. El mismo incluye el uso de ratones de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de edad.
- EL protocolo de producción de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales y producción de líquido ascítico fue aprobado por el CICUAL (N° Protocolo 004-25-16) de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. El mismo incluye el uso de ratones de la cepa BALB/c (de 6-8 semanas de edad) para producción de hibridomas y ascitis y ratones de la cepa Nude (de 6-8 semanas de edad) para producción de ascitis.

Todos los animales fueron alimentados, alojados y manipulados en estricto acuerdo con las recomendaciones, protocolos y orientación del CICUAL.

○ **CEPAS MURINAS UTILIZADAS**

Se adquirieron ratones de las cepas BALB/c, y Nude del Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y/o del Instituto Biológico Argentino S.A.I.C.

○ **PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN LÍQUIDO ASCÍTICO**

Una semana antes de inocular los hibridomas, se inocularon i.p. ratones Nude (según el origen del hibridoma) con Pristane (Sigma Aldrich®) (para inducir el crecimiento de los hibridomas en suspensión, sin que se fijen) a razón de 0,5 ml/ratón. Una semana después, se inocularon i.p. con una suspensión de células del hibridoma deseado lavadas con medio GKN a razón de $1,5 \cdot 10^6$ células/0,5 mL/ratón en PBS estéril. Se monitorearon los ratones asiduamente y cuando la colecta de líquido abdominal fue evidente se les comenzó a extraer líquido ascítico por punción peritoneal. Desde ese momento y hasta el punto final se trataron con analgesia Tramadol (Bagó) 30mg/kg s.c. cada 12-24hs.

○ **SDS-PAGE**

Muestras de líquido ascítico producido en ratones Nude o BALB/c conteniendo anticuerpos monoclonales se resuspendieron en buffer muestra conteniendo SDS, se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10% bis/acrilamida y se tiñeron con Coomassie Blue y fotografiaron.

○ **ELISAS CASEROS INDIRECTOS**

Titulación de anticuerpos IgG totales en sueros de ratones y sobrenadantes de esplenocitos: las placas se sensibilizaron con 4 µg/mL de HKBp o HKEc en buffer carbonato durante una noche a 4°C. Las placas se bloquearon con PBS-0,05% Tween-20-3% leche descremada en polvo a 37°C durante 1h. Luego se incubaron por 1-2 hs a 37°C con diluciones seriadas de los sueros de ratones, de las ascitis, de los anticuerpos monoclonales purificados o sobrenadantes de cultivo de hibridomas o de esplenocitos. Luego se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG total murino conjugado a peroxidasa HRP (BIO-RAD®, 1/10000 ó Sigma Aldrich®, 1/3000) para la detección. Se reveló con sustrato OPD en buffer citrato, se frenó la reacción con H₂SO₄ y se midió densidad óptica (DO) a 492nm.

- **CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR BCA**

Se determinó concentración proteica total de distintas muestras (ascitis, anticuerpos monoclonales purificados, sobrenadantes de cultivo, BpOMVs, HKBp, HKEc, etc.) con el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific™), según indicaciones del fabricante.

- **MODELO MURINO DE PROTECCIÓN CONTRA *BORDETELLA PERTUSSIS*. INMUNIZACIÓN PASIVA POR TRANSFERENCIA CELULAR O HUMORAL**

El esquema de vacunación activa es de dos dosis separadas por un período de catorce días. Catorce días post 2da dosis se realiza el desafío intranasal con una suspensión de *B. pertussis* TOH de 1×10^7 UFC/mL (dosis subletal) en PBS estéril previa anestesia inhalatoria con isoflurano. Siete días post desafío se sacrifican por dislocación cervical y los pulmones se disecan y homogenizan en 1 mL de PBS estéril. El homogenato se diluye en forma seriada y distintas diluciones se plaquean en BGA-sangre y se incuban durante 4-6 días a 37°C. Al cabo de este tiempo, se analiza el número de UFC provenientes de pulmón. Según corresponda, también se disecciona bazo para ensayo de respuesta celular in vitro y/o citometría de poblaciones linfocitarias. Para la inmunización pasiva, tanto celular como humoral, el esquema de inmunización es igual al activo, y a los catorce días post 2da dosis se disecciona el bazo y se realiza una suspensión celular de esplenocitos que se usarán para la transferencia de inmunidad celular, o se extrae sangre por punción submandibular de la vena superficial temporal, para obtener suero y realizar transferencia de inmunidad humoral. Se inocula la suspensión de células o el suero vía sistémica i.p. en ratones naive. 24 hs post inoculación, se realiza el desafío i.n. con una suspensión de *B. pertussis* TOH de 1×10^7 UFC/mL (dosis subletal) en PBS estéril previa anestesia inhalatoria con isoflurano. Siete días post desafío se sacrifican los animales y se diseccionan pulmones para recuento de UFC (en placas BGA-sangre) y/o bazo para ensayo de respuesta celular in vitro y/o análisis de poblaciones linfocitarias por citometría de flujo.

- **AISLAMIENTO DE OMVs**

Las OMVs se aislaron de células bacterianas *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. pertussis* mutante con el gen pagL, como se describió anteriormente^{30,276}. Brevemente, muestras de cultivo en crecimiento en desaceleración se centrifugaron a $10.000 \times g$ durante 20 min a 4°C y el sedimento bacteriano obtenido se resuspendió en buffer Tris 20 mM HCl, EDTA 2 mM pH 8,5 (buffer TE). 5 mL de buffer TE se utilizaron para resuspender aproximadamente 1 gr (peso

húmedo) de bacterias. La suspensión se sonicó en agua fría durante 20 min. Después de dos centrifugaciones a $10,000 \times g$ durante 20 min a 4°C , el sobrenadante se centrifugó a $100.000 \times g$ durante 2 hs a 4°C . El sedimento se resuspendió en 1,5% (p/v) de deoxicolato (DOC) en buffer TE. Se agregaron 6 mL de esta suspensión en 2 mL de sacarosa 60% (p/v). Después se centrifugó a $100.000 \times g$ durante 2 hs a 4°C y se observó la banda de OMVs en la interfase TE/sacarosa. Las OMVs se almacenaron con glicerol al 1% y azida sódica 0,001% a 4°C . Las muestras obtenidas para todas las cepas de *Bordetella* utilizadas se tiñeron negativamente y luego se examinaron con un microscopio electrónico.

○ **VACUNAS Y ADYUVANTES UTILIZADOS**

- Vacunas comerciales celulares wP: Sii (Serum Institute India), Vaksin (PT Bio Farma Bandung Indonesia).
- Vacunas comerciales acelulares aP: Boostrix/Bustrix (Gsk), Adacel (Sanofi Pasteur).
- BpOMV: 3 μg de proteínas totales de BpOMVs con los componentes tetánico y diftérico y $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante (de manera análoga a las formulaciones de las vacunas comerciales).
- Adyuvantes: $\text{Al}(\text{OH})_3$, Adyuvante de Freund Completo (SigmaAldrich®), Adyuvante de Freund Incompleto (SigmaAldrich®).

○ **DEPLECIÓN SISTÉMICA Y LOCAL DE LINFOCITOS CD4, CD8 Y B220 EN EL MODELO MURINO**

Se inocularon i.p. (sistémica) y/o i.n. (local) ascitis depletantes conteniendo anticuerpos monoclonales anti-CD4, anti-CD8 y/o anti-B220 (200 μg de proteína total/dosis) 24 hs antes y 24 y 72 hs después del desafío intranasal (inmunización activa), o 24 hs antes de la transferencia de bazo (inmunización pasiva).

○ **CULTIVO DE BACTERIAS/MEDIOS**

Los stocks bacterianos de *B. pertussis* y *B. parapertussis* se conservan como una suspensión en el medio sintético de Stainer-Scholte (SS) a -20°C en presencia de glicerol 50% v/v. A partir de estos stocks las cepas de *Bordetella* spp. utilizadas se cultivaron a 37°C durante 72 hs en placas de Petri conteniendo el medio Bordet Gengou suplementado con sangre desfibrinada de carnero al 10% v/v (BGA-sangre). Transcurridas las 72hs del primer cultivo se efectúa un subcultivo en el mismo medio durante 24 hs.

Detalle de la composición de los medios de cultivo:

Agar Bordet-Gengou Sangre (BGA-sangre)	
Agar Bordet-Gengou comercial (BD®)	15 g/L cultivo
Peptona (Difco®)	10 % p/v
Glicerina	1 % v/v

Una vez esterilizado se suplementa con 10% v/v de sangre de carnero desfibrinada.

Stainer- Scholte (SS)	
Glutamato de sodio monohidrato	10.7 g/L
L- Prolina	0.24 g/L
NaCl	2.50 g/L
KH ₂ PO ₄	0.50 g/L
KCl	0.20 g/L
MgCl ₂ .6 H ₂ O	0.10 g/L
CaCl ₂ .6 H ₂ O	0.02 g/L
Tris-HCl	1.52 g/L

Se lleva pH 7.2 con una solución de HCl concentrado y se esteriliza 15 minutos a 121°C. Luego se le adiciona el complemento esterilizado por filtración.

Complemento (20 ml 1000X)	
L-Cisteína	800 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	200 mg
Ac. Ascórbico	400 mg
Ac. Nicotínico	80 mg
HCl _(c)	2 mL

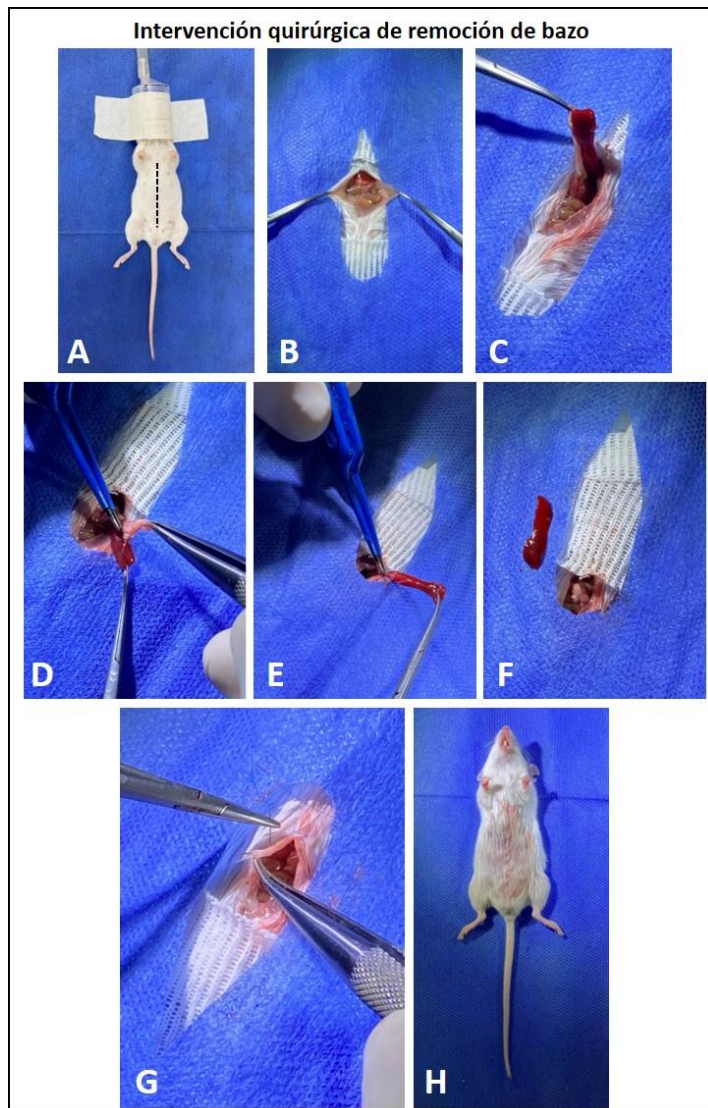
Se lleva a volumen final con H₂O destilada.

○ **PRODUCCIÓN DE BACTERIAS MUERTAS POR CALOR HKBp y HKEc**

Se toman 15-20 mL de cultivo líquido de *B. pertussis* TOH o *E. coli* S17-1 a DO=2 y se sonica con sonicador de punta hasta desaparición de turbidez. Se centrifuga durante 15 min a 10000 x g, se mide concentración proteica en sobrenadante, se alicuota y almacena a -20°C.

○ **PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO DE ESPLENECTOMÍA EN RATONES**

Estos procedimientos fueron realizados en conjunto con el Dr. Pablo Stringa, investigador del IIFP. Ratones BALB/c inmunizados según esquema de inmunización activa y luego de 15 días post segunda dosis, fueron anestesiados con Isoflurano (5% fase de inducción, 2-3% etapa de mantenimiento, O₂ 1 lt/min) inhalatorio (Foto 1, panel A). Una vez en plano anestésico, los



Procedimiento 1. Esplenectomía en ratones BALB/c.

ratones se colocaron en posición decúbito dorsal sobre la mesa operatoria y se procedió a la antisepsia de la región abdominal con alcohol 70°. Previamente a comenzar el procedimiento quirúrgico, se administraron 0.5 mL de solución fisiológica tibia y una dosis de Clorhidrato de Tramadol (30 mg/Kg) como analgésico por vía subcutánea.

La cirugía comienza con una incisión xifo-púbica de piel y del tejido celular subcutáneo (Procedimiento 1, panel A); a continuación, se accede a la cavidad abdominal por la línea media (o línea Alba) (Procedimiento 1, panel B). Mediante el uso de

instrumental de microcirugía (Foto 1, panel C), se procede a identificar el bazo en la región craneal izquierda del abdomen. A continuación, el bazo se exterioriza de la cavidad (Procedimiento 1, panel C) y los vasos esplénicos, mediante el uso de un coagulador bipolar, son coagulados y seccionados (Procedimiento 1, panel D y E). Una vez realizada la esplenectomía (Procedimiento 1, panel F), la cavidad abdominal se cierra con material Nylon monofilamento 7-0 (Foto 1, panel B), siguiendo un patrón de sutura continua en un plano (Procedimiento 1, panel G).



Foto 1. Material y equipos para la intervención quirúrgica de remoción de bazo. Vaporizador inhalatorio (A), suturas de nylon monofilamento 7-0 para cerrar la cavidad abdominal (B) y material de microcirugía (C).

Al finalizar la cirugía (Procedimiento 1, panel H), se administra un segundo bolo de 0.5 mL de Solución fisiológica por vía subcutánea.

Se hizo seguimiento post-operatorio de los animales con tratamiento analgésico con Clorhidrato de Tramadol (30 mg/Kg) por vía subcutánea cada 12hs las primeras 48hs post cirugía y cada 24hs los días subsiguientes hasta recuperación total (según signos de bienestar animal comportamiento/piloerección/cicatrización de sutura, etc.). Aproximadamente dos

semanas post cirugía se procedió al desafío intranasal con *B. pertussis* TOH según descrito con anterioridad.

- **ANTICUERPOS USADOS EN CITOMETRÍA/MICROSCOPIA**

anti-mouse CD3-FITC (Ligatis®) 1/1000

anti-mouse CD4-PE (Ligatis®) 1/2000

anti-mouse CD4-AF647 (casero) 1/1000

anti-mouse CD4-AF488 (casero) 1/200

anti-mouse CD8-PE (InvitroGen®) 1/500

anti-mouse CD8-APC (BD®) 1/1200

anti-mouse B220-FITC (BD®) 1/1500

- **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces con resultados similares. Los gráficos y el análisis de datos se realizaron utilizando GraphPad Prism8 (software GraphPad), usando ONE WAY ANOVA (test post-hoc de Bonferroni) o prueba t de Student (test post-hoc de Tukey). Todos los datos cuantitativos se expresan como media \pm SEM. A $P < 0,05$ ($p \leq 0,05$) se consideró estadísticamente significativo.

CAPÍTULO 2

- **CULTIVOS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO**

- CULTIVOS PRIMARIOS

- **Generación de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM)**

Se obtuvieron células de médula ósea de fémures y tibias de ratones C57BL/6 WT y deficientes, y se diferenciaron a BMDM utilizando un protocolo descrito anteriormente, con algunas modificaciones⁵³⁷. Brevemente, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a razón de 5×10^5 células/mL (día 0) y se mantienen en medio de cultivo DMEM-10% SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina (P), 100 μ g/mL de estreptomycin (S) y 20% de sobrenadante de cultivo de la línea L929 (productora de M-CSF murino, ver más adelante), a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 7 días. Al día 4 de incubación, el medio se reemplaza por completo.

- LINEAS CELULARES

- **L929** (fibroblastos murinos productores de M-CSF) se mantuvieron en medio DMEM-10%SFB (Gibco)-Hepes a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Se crecen en botella de 75 cm² con 50 mL de medio, cuando llegan a confluencia, se levantan con tryple, se llevan a 50 mL con PBS o medio base y se siembra 500 µl de esta suspensión por botella de 75cm² y se lleva a 50 mL de medio fresco. Se incuba en estufa 8-9 días, se colectan (*pooleando*) sobrenadantes, se filtra por 0,22 µm, se alicuota y freeza a -20°C.
- **THP-1** se mantuvieron en medio RPMI-10%SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y se sembraron en placas a razón de 2,5x10⁵ células/pocillo en placas de 48 pocillos. Se estimulan con estímulos según indicado, durante una noche. Se cosecha sobrenadante de cultivo y almacena a -80°C hasta su uso.
- **THP1-ASC-GFP** (InvivoGen®) (línea celular reportera de la proteína adaptadora ASC) se mantuvieron en medio RPMI-10%SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y se sembraron en placas a razón de 3,6x10⁵ células/pocillo en placas de 96 pocillos. Como control positivo se estimularon con 1 µg/mL de ECLPS ultrapuro (Sigma-Aldrich) durante 3hs (*prime*) y se transfectaron 500 ng/mL de pcDNA con Lipofectamine™ LTX Reagent with PLUS™ Reagent (Invitrogen®) según instrucciones del fabricante. Se estimularon con los distintos estímulos que se detallan en el texto y se incubaron durante una noche, los sobrenadantes se recolectaron y almacenaron a -80°C hasta su uso y las células se prepararon para el análisis por microscopía.
- **THP1-XBlue™-defMyD** (InvivoGen®) (línea celular reportera SEAP (fosfatasa alcalina secretada) de NF-kB/AP-1) se mantuvieron en medio RPMI-10%SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y se sembraron en placas a razón de 1,8x10⁵ células/pocillo en placas de 48 pocillos. Como control positivo se estimularon con 50 ng/ml de hTNFα, según recomendaciones del fabricante. Se estimularon con los distintos estímulos que se detallan en el texto y se

incubaron durante una noche, los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados a -80°C hasta su uso para medir citoquinas y actividad SEAP.

- **J774** se mantuvieron en medio DMEM-10%SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% y se sembraron en placas a razón de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en placas de 48 pocillos. Se estimulan con estímulos según indicado, durante una noche. Se cosecha sobrenadante de cultivo y almacena a -80°C hasta su uso para medir citoquinas.
- **RAW 264.7** se mantuvieron en medio DMEM-10%SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% y se sembraron en placas a razón de 2×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Se estimulan con estímulos según indicado, durante una noche. Se cosecha sobrenadante de cultivo y almacena a -80°C hasta su uso para medir citoquinas.

- ESTÍMULOS/INHIBIDORES/ANTIBIÓTICOS:

- Activadores el inflamosoma: Nigericina, ATP, transfección de BpLOS, EcLPS ultrapuro (InvitroGen®), BpDNA ó pcDNA (se generó mediante la clonación por PCR de un fragmento de ADNc de un gen aleatorio no relacionado) con Lipofectamine™ LTX Reagent with PLUS™ Reagent (Invitrogen®) o con HD FuGENE® (Promega®) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.
- Agonistas TLR: EcLPS ultrapure (InvitroGen®).
- Pro-inflamatorios: hTNF- α (PreproTech®).
- Inhibidores: KCl 80mM,
- Antibióticos: PS, polimixina B.
- Otros: DNasa I recombinante (Roche) se inactiva a 75°C por 10min; RNasa A (Qiagen®).

○ **OBSERVACIÓN DE PUNTOS ASC-GFP VERDES FLUORESCENTES POR MICROSCOPIA**

Las células THP1-ASC-GFP se recolectaron después de la estimulación ON, se lavaron con PBS y se centrifugaron en la misma placa. Los núcleos se tiñeron con DAPI y se realizó una fijación con PFA al 2%. El número total de células y de puntos ASC-GFP por campo fueron determinados utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti y analizados con el

software ImageJ. Cada condición experimental fue llevada a cabo por triplicado y se tomaron tres fotografías por pocillo. La relación entre las células con puntos verdes ASC-GFP fluorescentes intensos condensados sobre el número el total de células por campo fue calculado.

○ **ESTIMULACIÓN DE BMDM**

En todos los experimentos, las BMDM se mantuvieron en medio DMEM conteniendo 10% de SFB (Gibco) y PS. Las células se estimularon con BpOMVs (800 ng/mL), BpLOS libre o transfectado (800 ng/mL o 16 µg/mL), EcLPS libre o transfectado, pcDNA transfectado, BpDNA libre o transfectado o Nigericina, en 0,5 mL de DMEM + SFB al 10% + PS. Las pre-incubaciones con KCl 80 mM fue durante 1h, y la EcLPS 1 µg/mL durante 3hs (*prime*), según indicado en cada caso. Las transfecciones se llevaron a cabo con el reactivo de transfección HD FuGENE® (Promega®) o con Lipofectamine™ LTX Reagent with PLUS™ Reagent (Invitrogen®) según las especificaciones del fabricante. Los sobrenadantes se recogieron en los tiempos indicados. Las células fueron lavadas con PBS a temperatura ambiente, lisadas con 25 µL/pocillo con el reactivo de extracción de proteínas de mamíferos M-PER (Thermo Fisher Scientific) complementado con 1:100 de un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) + NaF 10mM y ortovanadato de sodio 1mM. Los lisados fueron recogidos en tubos de 1,5 ml. Ambos, los sobrenadantes y los lisados celulares se almacenaron a -80°C hasta su uso.

○ **AISLAMIENTO DE OMVs**

Las OMVs se aislaron de células bacterianas *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. pertussis* mutante con el gen PagL, como se describió anteriormente^{30,276}. Brevemente, muestras de cultivo en crecimiento en desaceleración se centrifugaron a 10.000 × g durante 20 min a 4°C y el sedimento bacteriano obtenido se resuspendió en buffer Tris 20 mM HCl, EDTA 2 mM pH 8,5 (buffer TE). 5 mL de buffer TE se utilizaron para resuspender aproximadamente 1 gr (peso húmedo) de bacterias. La suspensión se sonicó en agua fría durante 20 min. Después de dos centrifugaciones a 10,000 × g durante 20 min a 4°C, el sobrenadante se centrifugó a 100.000 × g durante 2 hs a 4°C. El sedimento se resuspendió en 1,5% (p/v) de deoxicolato (DOC) en buffer TE. Se agregaron 6 mL de esta suspensión en 2 mL de sacarosa 60% (p/v). Después se centrifugó a 100.000 × g durante 2 hs a 4°C y se observó la banda de OMVs en la interfase TE/sacarosa. Las OMVs se almacenaron con glicerol al 1% y azida sódica 0,001% a 4°C. Las

muestras obtenidas para todas las cepas de *Bordetella* utilizadas se tiñeron negativamente y luego se examinaron con un microscopio electrónico.

○ **EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS DE *Bordetella* spp.**

El lipooligosacárido (LOS) de las bacterias fue purificado por el método de extracción con fenol-agua en caliente^{538,539}. Brevemente, el microorganismo correspondiente fue crecido durante 72 hs a 37°C en agar Bordet Gengou (BD) suplementado con 10% de sangre desfibrinada (medio BGA-sangre), luego las colonias fueron plaqueadas en el mismo medio durante otras 24hs. El cultivo crecido en medio sólido se utilizó para inocular un cultivo líquido de Stainer-Scholte por 20 hs a 36°C hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial tardía. La biomasa obtenida se separó del medio de cultivo mediante centrifugación a 8000 x g por 30 min y luego fue resuspendida en PBS. Luego, se realizó la extracción mediante agregado de Fenol ácido en una proporción 1:1 con el buffer fosfato. La mezcla se homogeneizó e incubó por 15 minutos en un baño a 60°C y luego se incubó por otros 15 min en hielo. Finalmente se realizó una centrifugación a 4°C por 30 minutos a 8000 x g conservando la fase acuosa en la que se encuentra el Lipopolisacárido. Las muestras obtenidas fueron dializadas frente a agua bidestilada y se incubaron con pronasa (2 mg/mL) durante toda la noche a 37°C. La cuantificación de las muestras se realizó mediante medidas de peso seco de las muestras liofilizadas. La visualización de la calidad de las muestras de LPS obtenidas se determinó mediante corridas electroforéticas en geles SDS-PAGE. Para lo cual a una alícuota de cada muestra se le agregó buffer muestra (Dodecil sulfato de Sodio (SDS) 8% p/v, Glicerol 20% v/v, EDTA 0,004 M, Tris-HCl 0,2 M, pH 6,8, 0,01% de azul de bromofenol), se llevó a ebullición por 10 min y fue sonicada por 15 min. Las muestras así obtenidas se sembraron en geles de poliacrilamida 15% p/v con SDS.

○ **DECLARACIONES ÉTICAS**

En Argentina:

- El protocolo de derivación de BMDM fue aprobado por el CICUAL (N° Protocolo 005-06-15 prorrogado en vigencia hasta el 10 de agosto de 2023) de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. El mismo incluye el uso de ratones de la cepa C57BL/6 (de 6-8 semanas de edad).

Todos los animales fueron alimentados, alojados y manipulados en estricto acuerdo con las recomendaciones, protocolos y orientación del CICUAL.

En Brasil:

- Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Ley Federal de Brasil número 11.794, que regula el uso científico de los animales en Brasil, los lineamientos de los Comités Institucionales de Uso y Cuidado de Animales (IACUC), y los lineamientos de la Ley de Bienestar y los reglamentos establecidos por la Panel de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria sobre eutanasia. Los animales fueron alimentados, alojados y manipulados en estricto acuerdo con estas recomendaciones. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética en la Experimentación Animal (CETEA) de la Universidade Federal de Minas Gerais UFMG con permiso # 165/2019.

○ **CEPAS MURINAS UTILIZADAS**

- En Argentina, se adquirieron ratones de la cepa C57BL/6 de tipo salvaje (WT) del Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y/o del Instituto Biológico Argentino S.A.I.C.
- En Brasil, se adquirieron ratones C57BL/6 de tipo salvaje (WT) de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG). *Nlrp3*^{-/-} y *Casp1*/*11*^{-/-} se describieron previamente y se retrocruzaron con ratones C57BL/6 durante al menos ocho generaciones^{540,541}. Se generaron ratones *Casp11*^{-/-}, *Aim2*^{-/-}⁵⁴², *Gsdmd*^{-/-} y *Gbpchr3*^{-/-} en el *background* C57BL/6^{340,377,433}. Los animales se mantuvieron en la UFMG en ciclos de 12 hs de luz/oscuridad y se usaron entre las 6-9 semanas de la edad.

○ **WESTERN BLOT**

De mCaspasa-1 y mL-1 β en sobrenadante de cultivo de BMDM: Se tomaron los sobrenadantes y lisados de cultivo de BMDM de -80°C y se sometieron a análisis por SDS-PAGE y transferencia Western Blot. Las proteínas se resuspendieron en buffer muestra conteniendo SDS, se separaron en un gel de SDS-PAGE al 15% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) en buffer de transferencia (Tris 50 mM, glicina 40 mM, 10% metanol). Las membranas se bloquearon durante 1 h en TBS-0,1% Tween-20-5% leche descremada en polvo y se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios a 4°C. Se utilizaron anticuerpos monoclonales contra la subunidad p20 de Caspasa-1 (Adipogen, San Diego, CA, EE. UU.) y la subunidad p17 de IL-1 β (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) a una dilución 1:1000. El control de carga transferida se realizó con un anticuerpo monoclonal anti- β -actina (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) a una dilución 1:1000. Las membranas se

lavaron tres veces durante 5 min en TBS-0,1% Tween-20 y se incubó durante 1 h a 25°C con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa HRP correspondiente (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) a una dilución de 1:1000. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron usando el sustrato de HRP quimioluminiscente Luminol (Millipore) y analizado con el ImageQuant TL Software (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

○ **DETECCIÓN DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTES DE CULTIVO POR ELISA**

Los sobrenadantes de cultivo recolectados de las distintas células estimuladas se descongelaron el día del ensayo y se utilizaron para la determinación de concentraciones de mL-1 β , mL-1 α , mL-12p40 y mTNF- α utilizando el kit Mouse DuoSet ELISA (R&D Systems), según las especificaciones del fabricante. hIL-1 β , hIL-8, mL-6 se midieron usando OptEIA™ ELISA Set (BD®), según las especificaciones del fabricante. hIL-18, mL-1 β y mTNF- α fueron medidos usando kits de ELISA InvitroGen®, según las especificaciones del fabricante.

○ **qPCR EN TIEMPO REAL**

El ARN total de BMDM estimuladas se aisló utilizando el Reactivo TRIzol®, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó la transcripción reversa de 1 μ g del ARN total utilizando illustra™ Ready-To-Go RT-PCR Beads (GE Healthcare, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un equipo de real-time qPCR QuantStudio3 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores específicos para amplificar los fragmentos correspondientes a los targets genéticos que se utilizaron fueron: β -actina, forward, 5'-GGCTGTATCCCCTCCATCG-3', reverse, 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'; GBP1, forward, 5'-GAGTACTCTCTGGAAATGGCCTCAGAAA-3', reverse, TAGATGAAGGTGCTGCTGAGGAGGACTG-3'; GBP2, forward, 5'-CTGCACTATGTGACGGAGCTA-3', reverse, 5'-CGGAATCGTCTACCCCACTC-3'; GBP3, forward, 5'-CTGACAGTAAATCTGGAAGCCAT-3', reverse, 5'-CCGTCCTGCAAGACGATTCA-3'; GBP5, forward, 5'-CTGAACTCAGATTTTGTGCAGGA-3', reverse, 5'-CATCGACATAAGTCAGCACCAG-3'; GBP7, forward, 5'-TCCTGTGTGCCTAGTGGAAA-3', reverse, 5'-CAAGCGGTTTCATCAAGTAGGAT-3'; IFN- β , forward, 5'-GCCTTGCCATCCAAGAGATGC-3', reverse, 5'-ACACTGTCTGCTGGTGGAGTTC-3'. Todos los datos se presentan como unidades de expresión relativa a la expresión normalizada del gen de β -actina. Las medidas fueron realizadas por triplicado.

- **MEDIDA DE ACTIVIDAD LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)**

Se midió actividad enzimática lactato deshidrogenasa en sobrenadante de cultivo y lisados celulares (lisados con Cell Culture Lysis 5x Reagent de Promega®) de células THP-1 con el kit LDH-L (WienerLab) según especificaciones del fabricante. Se midió DO a 340nm en un lector espectrofotómetro de placas.

- **MEDIDA DE ACTIVIDAD SEAP**

Se midió actividad enzimática fosfatasa alcalina en sobrenadante de cultivo de células THP1-XBlue™-defMyD (InvivoGen®) y de HEK293T usando PNPP como sustrato disuelto en buffer FAL, se frenó la reacción con EDTA 0,1 M y se midió DO a 405nm en un lector espectrofotómetro de placas.

- **MARCACIÓN DE BpOMVs CON CFSE PARA CITOMETRÍA/MICROSCOPIA**

Se mezclaron 200 µg de BpOMVs con CFSE 5 µM final en PBS filtrado por membrana de 0,2 µm de diámetro de poro. Se incubó 20 min a 37°C y se centrifugó 30 min a 20000 x g. Se resuspendió el sedimento en 1 mL de PBS filtrado y se centrifugó 30 min a 20000 x g. Se resuspendió en 100 µL de PBS filtrado (concentración final 4 µg/µL).

- **ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN DE BpOMVs: MICROSCOPIA CONFOCAL/CITOMETRÍA**

Se estimularon macrófagos murinos BMDM ó J774 con 800 ng/mL de BpOMVs-CFSE ó BpOMVs. Se incubaron durante 5 hs y se prepararon para analizar por citometría de flujo y microscopía confocal. Para citometría: se lavan las células con PBS, se levantan y marcan con sonda de viabilidad LIVE/DEAD, F4/80, CD11b, MHCII, y en el caso de que hayan sido estimuladas con BpOMVs, se marcan éstas con anticuerpos monoclonales anti-GroEL 24G12H8-AF647 ó 52F2B9-AF647 previa permeabilización de las células con BD Perm/Wash™ buffer (BD®). Se centrifugan 10 min a 500 x g, se lavan con PBS y resuspenden en buffer FACS (PBS-2%SFB Natocor®). Se analizan por citómetro de flujo FACScalibur o FACSaria (BD®). Para microscopía: Si las células fueron estimuladas con BpOMVs-CFSE, éstas se lavan con PBS, se fijan con PFA al 2%, se marca núcleo con 10 µg/ml de IP en PBS durante 15 min a Tº ambiente, se lavan con PBS, montan y observan en microscopio confocal. Si las células fueron estimuladas con BpOMVs, éstas se lavan con PBS, se fijan con PFA al 2% durante 10 min a Tº ambiente, se permeabilizan con PBS 0,2%Triton X-100 por 10 min a Tº ambiente, se bloquea con PBS-0,1% Triton X-100-1% BSA por 30 min a Tº ambiente, se incuban con anticuerpos monoclonales anti-GroEL 24G12H8-AF647 ó 52F2B9-AF647 en PBS-0,1% Triton X-100 durante

1 h a T^o ambiente, se lavan con PBS, se marca núcleo con 10 µg/ml de IP en PBS durante 15 min a T^o ambiente, se lavan con PBS, montan y observan en microscopio confocal.

○ **ANTICUERPOS USADOS EN CITOMETRÍA/MICROSCOPIA**

- anti-mouse F4/80-PE (eBioscience[®]) 1/100
- anti-mouse F4/80-FITC (eBioscience[®]) 1/100
- anti-mouse F4/80-APC (InvitroGen[®]) 1/200
- anti-mouse MHCII-PE (eBioscience[®]) 1/2000
- anti-mouse CD11b-PerCyP (Immunotools[®]) 1/400
- anti-mouse CD11c-APC (eBioscience[®]) 1/150
- anti-mouse LAMP-1-PE (BD[®]) 1/40

○ **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces con resultados similares. Los gráficos y el análisis de datos se realizaron utilizando GraphPad Prism8 (software GraphPad), usando ONE WAY ANOVA (test post-hoc de Bonferroni) o prueba t de Student (test post-hoc de Tukey). Todos los datos cuantitativos se expresan como media ± SEM. A P<0,05 (p ≤ 0,05) se consideró estadísticamente significativo.

CAPÍTULO 3

○ **DECLARACIONES ÉTICAS**

En Argentina:

- EL protocolo de producción de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales y producción de líquido ascítico fue aprobado por el CICUAL (N° Protocolo 004-25-16) de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. El mismo incluye el uso de ratones de la cepa BALB/c (de 6-8 semanas de edad) para producción de hibridomas y ascitis y ratones de la cepa Nude (de 6-8 semanas de edad) para producción de ascitis.

Todos los animales fueron alimentados, alojados y manipulados en estricto acuerdo con las recomendaciones, protocolos y orientación del CICUAL.

- **CEPAS MURINAS UTILIZADAS**

En Argentina, se adquirieron ratones de la cepa BALB/c del Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y/o del Instituto Biológico Argentino S.A.I.C.

- **GENERACIÓN DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-BpOMVs**

Lotes de 5 ratones se inmunizaron por vía s.c. con 20 µg de BpOMVs con adyuvante de Freund Incompleto (AFI) (Sigma Aldrich®), al menos tres veces. Se hizo seguimiento de título de anticuerpos anti-HKBp mediante ELISA indirecto. El animal con mayor respuesta humoral se selecciona para la fusión. Tres días antes de la fusión del bazo, los ratones se inocularon i.p. con 3 µg de BpOMVs sin adyuvante. Se fusionaron los esplenocitos con células NSO como describen Köhler y Milstein⁴⁴⁵. Se procedió al *screening* de anticuerpos por ELISA, Dot Blot y Western Blot.

- **PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN LÍQUIDO ASCÍTICO**

Una semana antes de inocular las células clonadas, se inocularon i.p. ratones BALB/c con Pristane (Sigma Aldrich®) (para inducir el crecimiento de los hibridomas en suspensión, sin que se fijen) a razón de 0,5 mL/ratón. Una semana después, se inocularon i.p. con una suspensión de células del hibridoma deseado lavadas con medio GKN a razón de $1,5 \cdot 2 \times 10^6$ células/0,5 mL/ratón en PBS estéril. Se monitorearon los ratones asiduamente y cuando la colecta de líquido abdominal fue evidente se les comienza a extraer líquido ascítico por punción peritoneal. Desde ese momento y hasta el punto final se trataron con analgesia Tramadol (Bagó) 30 mg/kg s.c. cada 12-24 hs.

- **SDS-PAGE**

Muestras de líquido ascítico producido en ratones BALB/c conteniendo anticuerpos monoclonales se resuspendieron en buffer muestra conteniendo SDS, se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10% bis/acrilamida, se tiñeron con Coomassie Blue y se fotografiaron.

- **PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN LÍQUIDO ASCÍTICO**

Las purificaciones de proteínas fueron llevadas a cabo por la Unidad de Desarrollo del IIFP, principalmente a cargo del Lic. Matías Zapiola.

Para purificar las ascitis generadas en ratones BALB/c se tomaron 15 mL de ascitis y se precipitaron con sulfato de amonio saturado hasta una concentración del 50% de saturación.

La mezcla de ascitis y sulfato de amonio se dejó 24 hs en heladera a 4°C en agitación continua con buzo magnético. Luego de transcurrido el tiempo de incubación en la heladera, se centrifuga a 4500 x g por 30 min (Eppendorf centrifuge 5894R, rotor A-4-44, 5000 rpm). El pellet obtenido se dializa contra buffer binding (Spectra/Por dialysis membrane, MWCO: 12 - 14.000) durante 24 hs con agitación continua a 4°C en heladera. Una fracción de 5 mL de los anticuerpos monoclonales precipitados y dializados contra buffer binding se diluye con 15 mL en buffer binding y se purifica mediante cromatografía de afinidad con proteína A (5 mL, HiTrap rProtein A FF, GE Healthcare) en un sistema ÄKTA Start (GE Healthcare) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante de la columna. Brevemente, el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad incluye los siguientes pasos:

- Dilución de la muestra a precipitar en buffer binding,
- Carga de la muestra diluida en la columna de proteína A,
- Colección de la fracción no unida que pasa a través de la columna,
- Lavado de la fracción no unida hasta línea base y
- Elución en escalón en medio ácido y colección de las fracciones eluidas en un buffer neutralizante.

Luego se dializan contra PBS, se corren alícuotas de los tubos eluidos en SDS-PAGE y se aínan los tubos que presentan anticuerpos.

○ **CONJUGACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES AL FLUOROCROMO AF-647**

Los anticuerpos monoclonales anti-GroEL purificados (24G12H8 y 52F2B9) se conjugaron al fluorocromo AF-647 con el kit Alexa Fluor™ 647 Antibody Labeling (InvitroGen®), según indicaciones del fabricante.

○ **ELISAS CASEROS INDIRECTOS**

- Titulación de anticuerpos IgG totales en sueros de ratones, sobrenadante de hibridomas, ascitis, anticuerpos monoclonales purificados: las placas se sensibilizaron con 4 µg/mL de HKBp o HKEc, en buffer carbonato durante una noche a 4°C. Las placas se bloquearon con PBS-0,05% Tween-20-3% leche descremada en polvo a 37°C durante 1 h. Luego se incubaron por 1-2 hs a 37°C con diluciones seriadas de los sueros de ratones, de las ascitis, de los anticuerpos monoclonales purificados o sobrenadantes de cultivo de hibridomas o de esplenocitos. Luego se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG total murino conjugado a peroxidasa HRP (BIO-

- RAD[®], 1/10000 o Sigma Aldrich[®], 1/3000) para la detección. Se reveló con sustrato OPD en buffer citrato, se frenó la reacción con H₂SO₄ y se midió densidad óptica (DO) a 492nm.
- Isotipificación de anticuerpos monoclonales: las placas se sensibilizaron con 4 µg/mL de HKBp en buffer carbonato durante una noche a 4°C. Se bloqueó con PBS-0,05% Tween-20-3% leche descremada en polvo a 37°C durante 1 h. Luego se incubaron por 1-2 hs a 37°C con una dilución de los anticuerpos monoclonales en líquido ascítico. Luego se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG1, anti-IgG2a y anti-IgG3 murinos conjugados a HRP (BD[®]) 1/8000, 1/1000 y 1/1500 respectivamente, para la detección. Se reveló con sustrato OPD en buffer citrato, se frenó la reacción con H₂SO₄ y se midió densidad óptica (DO) a 492nm.
 - **CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR BCA**

Se determinó concentración proteica total de distintas muestras (ascitis, anticuerpos monoclonales purificados, sobrenadantes de cultivo, BpOMVs, HKBp, HKEc, etc.) con el kit Pierce[™] BCA Protein Assay (Thermo Scientific[™]), según indicaciones del fabricante.
 - **WESTERN BLOT**
 - De caracterización de anticuerpos monoclonales anti-BpOMVs en sobrenadante de cultivo, ascitis y anticuerpos monoclonales purificados: HKBp, HKEc, BpOMVs, rGroEL, BSA se sometieron a análisis por SDS-PAGE y transferencia Western Blot. Las proteínas se resuspendieron en buffer muestra conteniendo SDS, se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10% bis/acrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Amersham[™] Protran[™] Premium 0.45µm NC (GE Healthcare[®] Life science) en buffer de transferencia (Tris 50 mM, glicina 40 mM, 10% metanol). Las membranas se bloquearon durante 1h en TBS-0,1% Tween-20-5% leche descremada en polvo y se incubaron durante la noche con sobrenadante de cultivo, ascitis o anticuerpos monoclonales purificados a 4°C. Se utilizó anticuerpo anti-IgG total murino conjugado a peroxidasa HRP (BIO-RAD, 1/3000) y la detección fue realizada por quimioluminiscencia con Amersham[™] ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare[®] Life science) o con cloronaftol.
 - **ENSAYO DE OPSONOFAGOCITOSIS**

B. pertussis TOH o *B. parapertussis* ATCC que expresan proteína verde fluorescente (GFP) fueron opsonizadas por incubación a 37°C con un 20% de suero de ratones naive o inmunizados con BpOMV, aP, BppOMVATCC o con distintas diluciones de anticuerpos monoclonales en ascitis anti-GroEL durante 30 min. Se centrifugaron a 8000 x g por 15 min y

resuspendieron en RPMI-5% SFB. Las bacterias-GFP opsonizadas se incubaron con células RAW 264.7 con una multiplicidad de infección (MOI) de 70 durante 1 h a 37°C en agitación para permitir la unión e internalización. Se centrifugaron por 10 min a 500 x g, se lavaron con PBS y resuspendieron en RPMI-5% SFB-polimixina-B. Se incubaron 1 h a 37°C, se centrifugaron por 10min a 500 x g, se lavaron con PBS, resuspendieron en buffer FACS y se analizaron por citometría de flujo en un FACScalibur (BD®) y la fagocitosis se observó mediante la intensidad de fluorescencia media. Los resultados se expresan como intensidad media de fluorescencia.

○ **ENSAYO DE AGLUTINACIÓN**

Suspensiones de *B. pertussis* TOH, *B. pertussis* 1624, *P. aeruginosa* ATCC y *E. coli* S17-1 se incubaron a T° ambiente con un anticuerpo monoclonal anti-FIM2, suero policlonal anti-BpOMV o diluciones de ascitis anti-GroEL 24G12H8 ó 52F2B9 en un portaobjetos. Los coágulos se evidenciaron dentro de los 10 min.

○ **MARCACIÓN DE BpOMVs CON CFSE PARA CITOMETRÍA/MICROSCOPIA**

Se mezclaron 100 µg de BpOMVs con CFSE 5 µM final en PBS filtrado por membrana de 0,2 µm de diámetro de poro. Se incubó 20 min a 37°C y se centrifugó 30 min a 20000 x g. Se resuspendió el sedimento en 1 mL de PBS filtrado y se centrifugó 30 min a 20000 x g. Se resuspendió en 100 µL de PBS filtrado (concentración final 4 µg/µL).

○ **ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN DE BpOMVs MICROSCOPIA CONFOCAL/CITOMETRÍA**

Se estimularon macrófagos murinos BMDM ó J774 con 800 ng/mL de BpOMVs. Se incubaron durante 5hs y se prepararon para analizar por citometría de flujo y microscopía confocal. Para citometría: se lavan las células con PBS, se levantan y marcan con sonda de viabilidad LIVE/DEAD, F4/80, CD11b, MHCII, y en el caso de que hayan sido estimuladas con BpOMVs, se marcan éstas con anticuerpos monoclonales anti-GroEL 24G12H8-AF647 ó 52F2B9-AF647 previa permeabilización de las células con BD Perm/Wash™ buffer (BD®). Se centrifugan 10 min a 500 x g, se lavan con PBS y resuspenden en buffer FACS (PBS-2% SFB Natocor). Se analizan por citómetro de flujo FACScalibur o FACSAria (BD®). Para microscopía: Si las células fueron estimuladas con BpOMVs, éstas se lavan con PBS, se fijan con PFA al 2% durante 10 min a T° ambiente, se permeabilizan con PBS 0,2% Triton X-100 por 10 min a T° ambiente, se bloquea con PBS-0,1% Triton X-100-1% BSA por 30 min a T° ambiente, se incuban con anticuerpos monoclonales anti-GroEL 24G12H8-AF647 ó 52F2B9-AF647 en PBS-0,1% Triton X-

100 durante 1 h a T^o ambiente, se lavan con PBS, se marca núcleo con 10 µg/ml de IP en PBS durante 15 min a T^o ambiente, se lavan con PBS, montan y observan en microscopio confocal.

○ **CITOMETRÍA DE FLUJO DE BpOMVs**

Se sonica una suspensión de BpOMVs previamente marcadas con CFSE o sin marcar. Las BpOMVs sin marcar, se incuban con los anticuerpos monoclonales anti-GroEL 24G12H8-AF647, 52F2B9-AF647 ó control de isotipo-AF647. Se analizan por citómetro de flujo FACS Aria Fusion (BD[®]) en velocidad constante igual a 1, con nozzle 100 y se colectan eventos durante 1 minuto. Se usan Beads sintéticas fluorescentes FluoSpheres[®] carboxylated-modified microspheres de 0,2µm yellow-green fluorescent (505/515) (Molecular Probes[®]) para setear tamaño por FSC vs. SSC.

○ **ANTICUERPOS USADOS EN CITOMETRÍA/MICROSCOPIA**

anti-mouse F4/80-PE (eBioscience[®]) 1/100
 anti-mouse F4/80-FITC (eBioscience[®]) 1/100
 anti-mouse F4/80-APC (InvitroGen[®]) 1/200
 anti-mouse MHCII-PE (eBioscience[®]) 1/2000
 anti-mouse CD11b-PerCyP (Immunotools[®]) 1/400
 anti-mouse CD11c-APC (eBioscience[®]) 1/150

○ **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces con resultados similares. Los gráficos y el análisis de datos se realizaron utilizando GraphPad Prism8 (software GraphPad), usando ONE WAY ANOVA (test post-hoc de Bonferroni) o prueba t de Student (test post-hoc de Tukey). Todos los datos cuantitativos se expresan como media ± SEM. A P<0,05 (p ≤ 0,05) se consideró estadísticamente significativo.

CAPÍTULO 4

○ **CULTIVOS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO**

- LINEAS CELULARES

- **B16 reportera de IFNs tipo I** se mantuvieron en medio DMEM-10%SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y se sembraron en placas a razón de 1×10⁵ células/pocillo en placas

de 96 pocillos. Se estimulan con estímulos según indicado, durante una noche. Como control positivo se estimulan con 50 µg/mL de polyI:C (Sigma Aldrich®). Se cosecha sobrenadante de cultivo y almacena a -20°C (para medir actividad SEAP) ó a -80°C (para usarlo como fuente de IFNs tipo I) hasta su uso.

- **THP-1** se mantuvieron en medio RPMI-10%SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y se sembraron en placas a razón de 2,5x10⁵ células/pocillo en placas de 48 pocillos. Se estimulan con estímulos según indicado, durante una noche. Se cosecha sobrenadante de cultivo y almacena a -80°C hasta su uso.
- **THP1-ASC-GFP** (InvivoGen®) (línea celular reportera de la proteína adaptadora ASC) se mantuvieron en medio RPMI-10% SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y se sembraron en placas a razón de 3,6x10⁵ células/pocillo en placas de 96 pocillos. Como control positivo se estimularon con 1 µg/mL de EclPS ultrapuro (Sigma-Aldrich) durante 3 hs (*prime*) y se transfectaron 500 ng/mL de pcDNA con Lipofectamine™ LTX Reagent with PLUS™ Reagent (Invitrogen®) según instrucciones del fabricante. Se estimularon con los distintos estímulos que se detallan en el texto y se incubaron durante una noche, los sobrenadantes se recolectaron y almacenaron a -80°C hasta su uso y las células se prepararon para el análisis por microscopía.
- **THP1-XBlue™-defMyD** (InvivoGen®) (línea celular reportera SEAP (fosfatasa alcalina secretada) de NF-kB/AP-1) se mantuvieron en medio RPMI-10% SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y se sembraron en placas a razón de 1,8x10⁵ células/pocillo en placas de 48 pocillos. Como control positivo se estimularon con 50 ng/ml de hTNFα (PreproTech®), según recomendaciones del fabricante. Se estimularon con los distintos estímulos que se detallan en el texto y se incubaron durante una noche, los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados a -80°C hasta su uso para medir citoquinas y actividad SEAP.
- **J774** se mantuvieron en medio DMEM-10% SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y se

sembraron en placas a razón de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en placas de 48 pocillos. Se estimulan con estímulos según indicado, durante una noche. Se cosecha sobrenadante de cultivo y almacena a -80°C hasta su uso para medir citoquinas.

- **RAW 264.7** se mantuvieron en medio DMEM-10% SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% y se sembraron en placas a razón de 2×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Se estimulan con estímulos según indicado, durante una noche. Se cosecha sobrenadante de cultivo y almacena a -80°C hasta su uso para medir citoquinas.
- **B16 reportera IFN γ** se mantuvieron en medio DMEM-10% SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% y se sembraron en placas a razón de $7,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos. Se estimulan con estímulos según indicado, durante una noche. Como control positivo se estimulan con 5 ng/mL de mIFN γ (BD[®]). Se cosecha sobrenadante de cultivo y almacena a -20°C hasta su uso para medir actividad SEAP.
- **HEK reporteras hTLR4** se mantuvieron en medio DMEM-10% SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% y se sembraron en placas a razón de 3×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Se incuban durante una noche o hasta una confluencia del 70%, se cambia el medio y estimulan con estímulos según indicado, durante una noche. Se cosecha sobrenadante de cultivo y almacena a -20°C hasta su uso para medir actividad SEAP.
- **HeLa/NF κ B-luc** se mantuvieron en medio DMEM-10% SFB (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% y se sembraron en placas a razón de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos. Se incuban 48 hs, se lavan con PBS y se estimulan con estímulos según indicado. Como control positivo se estimulan con 10 ng/mL hTNF α (PreproTech[®]). Se incuban durante 5-6 hs, se descarta medio, se lavan con PBS

y se lisan con buffer lisis Cell Culture Lysis 5x Reagent (Promega®). Se almacenan los lisados a -20°C hasta su uso para medir actividad luciferasa.

- **Vero Cells (ATCC CCL 81).** Las células se cultivaron en medio mínimo esencial Eagle (MEM, lote n° SLBS0116V, SIGMA) suplementado con SFB al 10% a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5 % y se sembraron en placas de 96 pocillos a 1,5×10⁶ células/placa. En confluencia, las células se trataron con diferentes concentraciones de lidocaína para un ensayo citotóxico o se infectaron con SARS-CoV-2 para un ensayo de inhibición citopática viral.

- ESTIMULOS/INHIBIDORES/ANTIBIÓTICOS:

- Activadores el inflamosoma: transfección de pcDNA (se generó mediante la clonación por PCR de un fragmento de ADNc de un gen aleatorio no relacionado) con Lipofectamine™ LTX Reagent with PLUS™ Reagent (Invitrogen®) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Agonistas TLR: poly I:C (Sigma Aldrich®), EclPS ultrapure (InvitroGen®), FliC (producción propia), Pam3Cys-SK4 (EMC microcollections®).
- Pro-inflamatorios: hTNF-α (PreproTech®), mIFNγ (BD®)
- Antibióticos: PS.
- Otros: RNAsa A (Qiagen®).

○ **OBSERVACIÓN DE PUNTOS ASC-GFP VERDES FLUORESCENTES POR MICROSCOPIA**

Las células THP1-ASC-GFP se recolectaron después de la estimulación ON, se lavaron con PBS y se centrifugaron en la misma placa. Los núcleos se tiñeron con DAPI y se realizó una fijación con PFA al 2%. El número total de células y de puntos ASC-GFP por campo fueron determinados utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti y analizados con el software ImageJ. Cada condición experimental fue llevada a cabo por triplicado y se tomaron tres fotografías por pocillo. La relación entre las células con puntos verdes ASC-GFP fluorescentes intensos condensados sobre el número el total de células por campo fue calculado.

○ **MEDIDA DE ACTIVIDAD LUCIFERASA**

Se midió actividad enzimática luciferasa en lisados celulares (lisados con Cell Culture Lysis 5x Reagent de Promega®) de células HeLa/NFκB-luc usando el kit Luciferase Assay System

(Promega®), según indicaciones del fabricante. Se midió luminiscencia en un luminómetro Luminoskan TL Plus (Labsystems®).

○ **MEDIDA DE ACTIVIDAD SEAP**

Se midió actividad enzimática fosfatasa alcalina en sobrenadante de cultivo de células THP1-XBlue™-defMyD (InvivoGen®) y de HEK293T usando PNPP como sustrato disuelto en buffer FAL, se frenó la reacción con EDTA 0,1M y se midió DO a 405nm en un lector espectrofotómetro de placas.

○ **DECLARACIONES ETICAS**

En Argentina:

- El protocolo de producción de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales y producción de líquido ascítico fue aprobado por el CICUAL (N° Protocolo 004-25-16) de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. El mismo incluye el uso de ratones de la cepa BALB/c (de 6-8 semanas de edad) para producción de hibridomas y ascitis y ratones de la cepa Nude (de 6-8 semanas de edad) para producción de ascitis.

Todos los animales fueron alimentados, alojados y manipulados en estricto acuerdo con las recomendaciones, protocolos y orientación del CICUAL.

○ **GENERACIÓN DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-PROTEINAS S y N DEL VIRUS SARS-CoV-2**

Lotes de 5 ratones se inmunizaron por vía s.c. con 20 µg de proteína N ó RBD en adyuvante de Freund Completo (AFC) (Sigma Aldrich®) (la primera dosis) y en AFI las subsiguientes, al menos tres veces. Se hizo seguimiento de título de anticuerpos anti-N/RBD mediante ELISA indirecto. El animal con mayor respuesta humoral se seleccionó para la fusión. Tres días antes de la fusión del bazo, los ratones se inocularon i.p. con 10 µg de N ó RBD sin adyuvante. Se fusionaron los esplenocitos con células NS0 como describen Köhler y Milstein⁴⁴⁵. Se procedió al *screening* de anticuerpos por ELISA, Dot Blot y Western Blot.

○ **PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN LÍQUIDO ASCÍTICO**

Una semana antes de inocular las células clonadas, se inocularon i.p. ratones BALB/c o Nude (según la agresividad o rendimiento del clon) con Pristane (Sigma Aldrich®) (para inducir el crecimiento de los hibridomas en suspensión, sin que se fijen) a razón de 0,5 mL/ratón. Una

semana después, se inocularon i.p. con una suspensión de células del hibridoma deseado lavadas con medio GKN a razón de $1,5-2 \times 10^6$ células/0,5 mL/ratón en PBS estéril. Se monitorearon los ratones asiduamente y cuando la colecta de líquido abdominal fue evidente se les comienza a extraer líquido ascítico por punción peritoneal. Desde ese momento y hasta el punto final se trataron con analgesia Tramadol (Bagó) 30mg/kg s.c. cada 12-24hs.

○ **SDS-PAGE**

Muestras de líquido ascítico producido en ratones Nude o BALB/c conteniendo anticuerpos monoclonales se resuspendieron en buffer muestra conteniendo SDS, se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10% bis/acrilamida, se tiñeron con Coomassie Blue y se fotografiaron.

○ **WESTERN BLOT**

- De caracterización de anticuerpos monoclonales anti-RBD/N purificados: proteínas RBD y N recombinantes se sometieron a análisis por SDS-PAGE y transferencia Western Blot. Las proteínas se resuspendieron en buffer muestra conteniendo SDS, se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10% bis/acrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Amersham™ Protran™ Premium 0.45 μ m NC (GE Healthcare® Life science) en buffer de transferencia (Tris 50 mM, glicina 40 mM, 10% metanol). Las membranas se bloquearon durante 1 h en TBS-0,1% Tween-20-5% leche descremada en polvo y se incubaron durante la noche con los anticuerpos monoclonales purificados a 4°C. Se utilizó anticuerpo anti-IgG total murino conjugado a peroxidasa HRP (BIO-RAD, 1/3000) y la detección fue realizada por quimioluminiscencia con Amersham™ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare® Life science) o con cloronaftol por depósito de producto.

○ **PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN LÍQUIDO ASCÍTICO**

Las purificaciones de proteínas fueron llevadas a cabo por la Unidad de Desarrollo del IIFP, principalmente a cargo del Lic. Matías Zapiola.

Para purificar las ascitis generadas en ratones BALB/c y Nude se tomaron 15 mL de ascitis y se precipitaron con sulfato de amonio saturado hasta una concentración del 50% de saturación. La mezcla de ascitis y sulfato de amonio se dejó 24 hs en heladera a 4°C en agitación continua con buzo magnético. Luego de transcurrido el tiempo de incubación en la heladera, se centrifuga a 4500 x g por 30 min (Eppendorf centrifuge 5894R, rotor A-4-44, 5000 rpm). El pellet obtenido se dializa contra buffer binding (Spectra/Por dialysis membrane, MWCO: 12 - 14.000) durante 24 hs con agitación continua a 4°C en heladera. Una fracción de 5 mL de los

anticuerpos monoclonales precipitados y dializados contra buffer binding se diluye con 15 mL en buffer binding y se purifica mediante cromatografía de afinidad con proteína A (5 mL, HiTrap rProtein A FF, GE Healthcare) en un sistema ÄKTA Start (GE Healthcare) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante de la columna. Brevemente, el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad incluye los siguientes pasos:

- Dilución de la muestra a precipitar en buffer binding,
- Carga de la muestra diluida en la columna de proteína A,
- Colección de la fracción no unida que pasa a través de la columna,
- Lavado de la fracción no unida hasta línea base y
- Elución en escalón en medio ácido y colección de las fracciones eluidas en un buffer neutralizante.

Luego se corren alícuotas de los tubos eluidos en SDS-PAGE, se aínan los tubos que presentan anticuerpos y se dializan contra PBS.

○ **ELISAS CASEROS INDIRECTOS**

- Titulación de anticuerpos IgG totales en sueros de ratones, sobrenadante de hibridomas, ascitis, anticuerpos monoclonales purificados: las placas se sensibilizaron con 1 µg/mL de proteína N o proteína S, en buffer carbonato durante una noche a 4°C. Las placas se bloquearon con PBS-0,05% Tween-20-3% leche descremada en polvo a 37°C durante 1 h. Luego se incubaron por 1-2 hs a 37°C con diluciones seriadas de los sueros de ratones, de las ascitis, de los anticuerpos monoclonales purificados o sobrenadantes de cultivo de hibridomas. Luego se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG total murino conjugado a HRP (BIO-RAD®, 1/10000 o Sigma Aldrich®, 1/3000) para la detección. Se reveló con sustrato OPD en buffer citrato, se frenó la reacción con H₂SO₄ y se midió densidad óptica (DO) a 492nm.
- Isotipificación de anticuerpos monoclonales: las placas se sensibilizaron con 1 µg/mL de proteína N o proteína S en buffer carbonato durante una noche a 4°C. Se bloqueó con PBS-0,05% Tween-20-3% leche descremada en polvo a 37°C durante 1 h. Luego se incubaron por 1-2 hs a 37°C con una dilución de los anticuerpos monoclonales en líquido ascítico. Luego se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG1, anti-IgG2a y anti-IgG3 murinos conjugados a HRP (BD®) 1/8000, 1/1000 y 1/1500 respectivamente, para la detección. Se reveló con sustrato OPD en buffer citrato, se frenó la reacción con H₂SO₄ y se midió densidad óptica (DO) a 492nm.

-

- **CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR BCA**

Se determinó concentración proteica total de distintas muestras (ascitis, anticuerpos monoclonales purificados) con el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific™), según indicaciones del fabricante.

- **IFI INDIRECTA DE CÉLULAS INFECTADAS CON SARS-CoV-2 CEPA WUHAN**

Para generar las improntas de células infectadas (Malbrán), se cultivan células Vero, se infectan con SARS-CoV-2 cepa Wuhan y cuando se observa efecto citopático (al microscopio) se cosechan las células. Se mezclan en una relación 2:1 células infectadas:células no infectadas, se lavan con PBS (pH 7,2), centrifugan y resuspenden a una concentración de 1×10^6 células/mL y se siembran 15-20 μ l de suspensión celular por *spot* de portaobjetos. Se deja secar en flujo y se sumergen en coplin con acetona fría (-20°C) por 10 minutos, luego se lleva a heladera por lo menos 30 min más. Se guardan los portaobjetos a -80°C hasta su uso.

IFI: se dispensa 10 μ l/*spot* del anticuerpo primario dilución de uso en PBS pH 7,6. (Suero ratón 1/50, anticuerpos monoclonal purificado anti-N 1/100, anticuerpo monoclonal purificado anti-RBD 1/15, anticuerpo monoclonal purificado control de isotipo 1/50). Se incuba 1 h a 37°C en cámara húmeda, se realizan 3 lavados de 10 min c/u con PBS pH 7,6. Se seca bajo secador de manos/flujo y se dispensa 10 μ l/*spot* del anticuerpo secundario policlonal hecho en cabra anti-ratón-AF488 1/300 (Abcam®) en Azul de Evans 0,01% (todo en PBS pH 7,6). Se incuba 30 min a 37°C en cámara húmeda, se realizan 3 lavados de 10 min c/u con PBS pH 7,6, se seca bajo secador de manos/flujo, se monta el preparado y se observa en microscopio de fluorescencia/confocal.

- **AISLAMIENTO DE ARN A PARTIR DE CÉLULAS CALU-3 Y RTqPCR**

El ARN total de células Calu-3 infectadas con SARS-CoV-2 (cepa Wuhan) se aisló con el kit RNA Spin Mini (GE Healthcare). La transcripción inversa se realizó usando 1 μ g del ARN total usando polimerasa MML-V y se usaron cebadores aleatorios de Molecular Probes Inc., (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando SYBER Green Supermix (Invitrogen, cat 11761-100, EE. UU.) en un IQ-Cycler (Bio-Rad). Se utilizaron los cebadores específicos para amplificar fragmentos correspondientes a dianas génicas específicas: β -actin, forward, 5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3', reverse, 5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT-3'; CXCL10, forward, 5'-TCC ACG TGT TCA GAT CAT TGC-3', reverse, 5'-TGA TGG CCT TCG ATT CTG G-3'; CCL20, forward, 5'-CCA AGA GTT TGC TCC TGG CT-3', reverse, 5'-TGC

TTG CTG CTT CTG ATT CG-3'; Mx-1, forward, 5'-GCC GGC TGT GGA TAT GCT-3', reverse, 5'-TTT TTT ATC GAA ACA TCT GTG AAA GC-3'; CXCL2, forward, 5'-AAG GTG AAG TCC CCC GGA C-3', reverse, 5'-GCC CAT TCT TGA GTG TGG CT-3'. Todos los datos se presentan como unidades de expresión relativas después de la normalización al gen de la β -actina. Las mediciones se realizaron por triplicado.

○ **CEPA SARS-CoV-2 UTILIZADA PARA INFECTAR CÉLULAS VERO**

En este estudio se utilizó una cepa local de SARS-CoV-2 aislada de una muestra clínica positiva para COVID-19 en Buenos Aires, Argentina. Esta cepa fue caracterizada *in vitro* por personal del "Servicio Virosis Respiratorias INEI-ANLIS-Malbrán"; también se secuenció el genoma viral completo (números de acceso de GISAID EPI_ISL_420600). El stock viral se produjo infectando células VERO y se tituló siguiendo los procedimientos estándar, el método de Reed y Muench y se expresó en una dosis infectiva de cultivo de tejido del 50% (TCID₅₀)/ml⁵⁴³.

○ **INHIBICIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO VIRAL SOBRE CÉLULAS VERO**

Esta prueba consistió en agregar Lidocaína en las fases a) de preincubación y b) de incubación.

a) Se realizó por triplicado añadiendo 100 μ l/pocillo de MEM suplementado con SFB 2% y una mezcla de antibiótico-antimicótico al 1% (100X, Gibco) y Lidocaína 1 mM. La incubación fue de 1 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente se descartó el inóculo, se realizó dos lavados estériles con PBS 1X pH 7.2 y las monocapas se infectaron con el virus SARS-CoV-2 D614G a razón de 10³ TCID₅₀/mL. Después de 1 h de adsorción, se retiró el inóculo, se realizaron 2 lavados y se añadieron 200 μ l/por pocillo de MEM suplementado con SFB al 2% y antibiótico-antimicótico al 1% (100 X, Gibco). b) Se descartó el medio y se infectaron las monocapas con virus SARS-CoV-2 D614G a razón de 10³ TCID₅₀/mL más lidocaína 1 mM (concentración final). Después de 1 h de adsorción a 37°C en atmósfera 5% CO₂, se retiró el inóculo, se realizaron dos lavados estériles 1X PBS pH 7.2 y se administraron 200 μ l/por pocillo de MEM suplementado con 2% SFB y 1% antibiótico-antimicótico (100X Gibco) más 1 mM de lidocaína. Se incluyeron controles negativos (células incubadas sin lidocaína y células incubadas en presencia de lidocaína 1 mM) y control positivo (células infectadas con el virus SARS-CoV-2 D614G a razón de 10³ TCID₅₀/ml).

El desarrollo del efecto citopático se controló tanto en ensayos de preincubación como de incubación hasta 96 horas después de la infección.

- **MODULACIÓN IN VITRO CON LIDOCAINA Y DEXAMETASONA**

Todos los ensayos de modulación con Lidocaína en combinación o no con Dexametasona se llevaron a cabo modulando las células a las concentraciones indicadas desde 30 min antes de agregar el estímulo y durante todo el tiempo de incubación indicada.

- **DETECCIÓN DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTES DE CULTIVO POR ELISA**

Los sobrenadantes de cultivo recolectados de las distintas células estimuladas se descongelaron el día del ensayo y se utilizaron para la determinación de concentraciones de hIL-1 β , hIL-8, mL-6 usando OptEIA™ ELISA Set (BD®), según las especificaciones del fabricante. hIL-18, mL-1 β y mTNF- α fueron medidos usando kits de ELISA InvitroGen®, según las especificaciones del fabricante.

- **ANTICUERPOS USADOS EN MICROSCOPIA**

anti-mouse IgGtotal-AF488 (Abcam®) 1/300

- **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces con resultados similares. Los gráficos y el análisis de datos se realizaron utilizando GraphPad Prism8 (software GraphPad), usando ONE WAY ANOVA (test post-hoc de Bonferroni) o prueba t de Student (test post-hoc de Tukey). Todos los datos cuantitativos se expresan como media \pm SEM. A $P < 0,05$ ($p \leq 0,05$) se consideró estadísticamente significativo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gaillard, M. E., Bottero, D., Moreno, G., Rumbo, M. & Hozbor, D. Strategies and new developments to control pertussis, an actual health problem. *Pathogens and disease* vol. 73 ftv059 (2015).
2. Mooi, F. R. & Maas, N. A. T. V. A. N. D. E. R. Pertussis resurgence : waning immunity and pathogen adaptation – two sides of the same coin. *epidemiol. infect.* 685–694 (2013) doi:10.1017/S0950268813000071.
3. Sealey, K. L., Belcher, T. & Preston, A. Bordetella pertussis epidemiology and evolution in the light of pertussis resurgence. *MEEGID* (2016) doi:10.1016/j.meegid.2016.02.032.
4. Lapidot, R. & Gill, C. J. The Pertussis resurgence : putting together the pieces of the puzzle. *Trop. Dis. Travel Med. Vaccines* 1–10 (2016) doi:10.1186/s40794-016-0043-8.
5. Esposito, S. *et al.* Pertussis Prevention : Reasons for Resurgence , and Differences in the Current Acellular Pertussis Vaccines. *Front. Immunol.* **10**, 1–11 (2019).
6. Fullen, A. R., Yount, K. S., Dubey, P. & Deora, R. Whoop! there it is: The surprising resurgence of pertussis. *PLoS Pathogens* vol. 16 (2020).
7. Bridget M. Kuehn. ACIP : Give Pertussis Vaccine During Every Pregnancy. 2013 (2012).
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis vaccine (Tdap) in pregnant women--Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2012. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **62**, 131–5 (2013).
9. Forsyth, K. D., Wirsing von Konig, C. H., Tan, T., Caro, J. & Plotkin, S. Prevention of pertussis: Recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting. *Vaccine* **25**, 2634–2642 (2007).
10. Plotkin, S. A., Orenstein, W. A., Offit, P. A. & Edwards, K. M. *Vaccines*. (Elsevier, 2018).
11. Hozbor, D. New Pertussis Vaccines: A Need and a Challenge. *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 1183 115–126 (2019).
12. Mielcarek, N. *et al.* Attenuated Bordetella pertussis: New live vaccines for intranasal immunisation. *Vaccine* **24**, (2006).
13. Thorstensson, R. *et al.* A Phase I Clinical Study of a Live Attenuated Bordetella pertussis Vaccine - BPZE1 ; A Single Centre , Double-Blind , Placebo-Controlled , Dose-Escalating Study of BPZE1 Given Intranasally to Healthy Adult Male Volunteers. *PLoS One* **9**, (2014).
14. Mielcarek, N., Debrie, A., Mahieux, S. & Loch, C. Dose Response of Attenuated Bordetella pertussis BPZE1-Induced Protection in Mice. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 317–324 (2010).
15. Feunou, P., Kammoun, H. & Debrie, A. Long-term immunity against pertussis induced by a single nasal administration of live attenuated B . pertussis BPZE1. *Vaccine* **28**, 7047–7053 (2010).
16. Skerry, C. M. *et al.* A Live Attenuated Bordetella pertussis Candidate Vaccine Does Not Cause Disseminating Infection in Gamma Interferon Receptor Knockout Mice. *Clin. Vaccine Immunol.* **16**, 1344–1351 (2009).
17. Loch, C. & Mielcarek, N. Live attenuated vaccines against pertussis. *Expert Rev. Vaccines* **13**, 1147–1158 (2014).
18. Loch, C. Live pertussis vaccines : will they protect against carriage and spread of pertussis ? *Clin. Microbiol. Infect.* 1–7 (2016) doi:10.1016/j.cmi.2016.05.029.
19. Loch, C. *et al.* Live Attenuated Pertussis Vaccine BPZE1 Protects Baboons Against Bordetella pertussis Disease and Infection. *J. Infect. Dis.* **216**, 117–124 (2017).
20. Solans, L. & Loch, C. The Role of Mucosal Immunity in Pertussis. *Front. Genet.* **9**, 1–10 (2019).

21. Jahnmatz, M. *et al.* Safety and immunogenicity of the live attenuated intranasal pertussis vaccine BPZE1: a phase 1b, double-blind, randomised, placebo-controlled dose-escalation study. *Lancet Infect. Dis.* **20**, 1290–1301 (2020).
22. Dias, W. O. *et al.* An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. *Hum. Vaccines Immunother.* **9**, 339–348 (2012).
23. Arenas, J. *et al.* Shortening the lipid A acyl chains of Bordetella pertussis enables depletion of lipopolysaccharide endotoxic activity. *Vaccines* **8**, 1–20 (2020).
24. Rohner, G. B. *et al.* Boosting teenagers with acellular pertussis vaccines containing recombinant or chemically inactivated pertussis toxin: a randomized clinical trial. *Clin. Infect. Dis.* (2018) doi:10.1093/cid/ciy594/5059783.
25. Cheung, G. Y. C. *et al.* Effect of Different Forms of Adenylate Cyclase Toxin of Bordetella pertussis on Protection Afforded by an Acellular Pertussis Vaccine in a Murine Model. *Infect. Immun.* **74**, 6797–6805 (2006).
26. Marr, N. *et al.* Protective activity of the Bordetella pertussis BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. *Vaccine* **26**, 4306–4311 (2008).
27. Alvarez, J. *et al.* Bordetella pertussis iron regulated proteins as potential vaccine components. *Vaccine* **1605**, 1–6 (2013).
28. Agnolon, V. *et al.* The potential of adjuvants to improve immune responses against Tdap vaccines: A preclinical evaluation of MF59 and monophosphoryl lipid A. *Int. J. Pharm.* **492**, 169–176 (2015).
29. Misiak, A. *et al.* Addition of a TLR7 agonist to an acellular pertussis vaccine enhances Th1 and Th17 responses and protective immunity in a mouse model. *Vaccine* **35**, 5256–5263 (2017).
30. Roberts, R. *et al.* Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine* **26**, 4639–4646 (2008).
31. Gaillard, M. E. *et al.* Acellular pertussis vaccine based on outer membrane vesicles capable of conferring both long-lasting immunity and protection against different strain genotypes. *Vaccine* **32**, 931–937 (2014).
32. Bottero, D. *et al.* Characterization of the immune response induced by pertussis OMVs-based vaccine. *Vaccine* **34**, 3303–3309 (2016).
33. Zurita, M. E. *et al.* A Pertussis Outer Membrane Vesicle-Based Vaccine Induces Lung-Resident Memory CD4 T Cells and Protection against Bordetella pertussis, including Pertactin Deficient Strains. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 1–11 (2019).
34. Schwartz, J. L. & Mahmoud, A. When not all that counts can be counted: Economic evaluations and the value of vaccination. *Health Aff.* **35**, 208–211 (2016).
35. Bloom, D. E., Fan, V. Y. & Sevilla, J. P. The broad socioeconomic benefits of vaccination. *Sci. Transl. Med.* **10**, 1–4 (2018).
36. Rodrigues, C. M. C. & Plotkin, S. A. Impact of Vaccines; Health, Economic and Social Perspectives. *Front. Microbiol.* **11**, (2020).
37. Plotkin, S. A. & Plotkin, S. L. The development of vaccines: how the past led to the future. *Nat. Publ. Gr.* **9**, 889–893 (2011).
38. Hall, A. The Global Eradication of Smallpox. Final Report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication. *Postgraduate Medical Journal* vol. 58 734–735 (1982).
39. Pan American Health Organization. Elimination of rubella and congenital rubella syndrome in the Americas. 2015 (2015).
40. Pan American Health Organization. Plan of Action for Maintaining Measles, Rubella, and Congenital Rubella Syndrome Elimination in the Region of the Americas: Final Report. 26–30 (2016).
41. OPS/OMS. Region of the Americas eliminates maternal and neonatal tetanus. *Washington, D.C.: OPS/OMS* vol. 21 septiem (2017).

42. Jones, K. E. *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* **451**, 990–993 (2008).
43. One Health Initiative Task Force. One health: A new professional imperative. *Am. Vet. Med. Assoc.* **76** (2008).
44. Masseria, C. *et al.* Incidence and burden of pertussis among infants less than 1 year of age. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **36**, e54–e61 (2017).
45. Somerville, R. L. *et al.* Infants hospitalised with pertussis: Estimating the true disease burden. *J. Paediatr. Child Health* **43**, 617–622 (2007).
46. Tanaka, M. *et al.* Trends in Pertussis among Infants in the United States, 1980–1999. *J. Am. Med. Assoc.* **290**, 2968–2975 (2003).
47. He, Q., Viljanen, M. K., Arvilommi, H., Aittanen, B. & Mertsola, J. Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *Journal of the American Medical Association* vol. 280 635–637 (1998).
48. Mattoo, S., Foreman-Wykert, A. K., Cotter, P. A. & Miller, J. F. MECHANISMS OF BORDETELLA PATHOGENESIS. *Front. Biosci.* **6**, 168–186 (2001).
49. Ong, W. I. F., Imms, V. E. T., Olmes, N. A. H. & Intchenko, V. I. S. Detection and incidence of *Bordetella holmesii* in respiratory specimens from patients with pertussis-like symptoms in New South Wales, Australia. **50**, 322–326 (2018).
50. Tozzi, A. E. *et al.* Clinical Presentation of Pertussis in Unvaccinated and Vaccinated Children in the First Six Years of Life. *Pediatrics* (2003) doi:10.1542/peds.112.5.1069.
51. Mattoo, S. & Cherry, J. D. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and their *Bordetella* Subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 326–382 (2005).
52. Murray, E. L. *et al.* Characteristics of Severe *Bordetella pertussis* Infection Among Infants ≤90 Days of Age Admitted to Pediatric Intensive Care Units - Southern California, September 2009–June 2011. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* (2013).
53. Cherry, J. D. & Paddock, C. D. Pathogenesis and histopathology of pertussis: Implications for immunization. *Expert Rev. Vaccines* **13**, 1115–1123 (2014).
54. Christie, C. D. C. & Baltimore, R. S. Pertussis in Neonates. *Am. J. Dis. Child.* **143**, 1199–1202 (1989).
55. Dauer, C. C. Reported Whooping Cough Morbidity and Mortality in the United States. *Public Heal. Reports* **58**, 661–676 (1943).
56. Goulin, G. D., Kaya, K. M. & Bradley, J. S. Severe pulmonary hypertension associated with shock and death in infants infected with *Bordetella pertussis*. *Crit. Care Med.* **21**, (1993).
57. Vitek, C. R., Pascual, F. B., Baughman, A. L. & Murphy, T. V. Increase in deaths from pertussis among young infants in the United States in the 1990s. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22**, 628–634 (2003).
58. Donoso, A., José, L., Ramírez, M., Rojas, G. & Oberpaur, B. Pertussis and fatal pulmonary hypertension: A discouraged entity. *Case Reports* 145–148 (2004) doi:10.1080/00365540510026436.
59. Williams, G. D., A., N., J., S., V., T. & J., D. B. ECLS in pertussis: Does it have a role? *Intensive Care Med.* **24**, 1089–1092 (1998).
60. De Berry, B. B., Lynch, J. E., Chung, D. H. & Zwischenberger, J. B. Pertussis with severe pulmonary hypertension and leukocytosis treated with extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatr. Surg. Int.* **21**, 692–694 (2005).
61. Paddock, C. D. *et al.* Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 328–338 (2008).
62. Cherry, J. D. & Heininger, U. Pertussis and other *Bordetella* infections. in *Feigin and Cherry's textbook of Pediatric Infectious Diseases* (Elsevier/ Saunders, 2014).
63. Warfel, J. M., Beren, J. & Merkel, T. J. Airborne transmission of *Bordetella pertussis*. *J. Infect. Dis.* **206**, 902–906

- (2012).
64. Edmunds, M. *et al.* Retrospective cohort study investigating extent of pertussis transmission during a boarding school outbreak, England, December 2017 to June 2018. *Eurosurveillance* **5**, 1–9 (2021).
 65. Horby, P. *et al.* A boarding school outbreak of pertussis in adolescents: Value of laboratory diagnostic methods. *Epidemiol. Infect.* **133**, 229–236 (2005).
 66. Kara, E. O. *et al.* Survey of household contacts of infants with laboratory-confirmed pertussis infection during a national pertussis outbreak in England and Wales. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **36**, 140–145 (2017).
 67. Pinto, M. V. & Merkel, T. J. Pertussis disease and transmission and host responses: insights from the baboon model of pertussis. *J. Infect.* **74**, S114–S119 (2017).
 68. Wiley, K. E., Zuo, Y., Macartney, K. K. & McIntyre, P. B. Sources of pertussis infection in young infants : A review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. *Vaccine* **31**, 618–625 (2013).
 69. Leslie, B. Y. P. H. & Gardner, A. D. THE PHASES OF HAEMOPHILUS PERTUSSIS. *J. Hyg.* (1923).
 70. Jones, A. M., Boucher, P. E., Williams, C. L., Stibitz, S. & Cotter, P. A. Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*. *Mol. Microbiol.* **58**, 700–713 (2005).
 71. Merkel, T. J., Boucher, P. E., Stibitz, S. & Grippe, V. K. Analysis of bvgR Expression in *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* **185**, 6902–6912 (2003).
 72. Weiss, A. A., Melton, A. R., Walker, K. E., Androaos-Selim, C. & Meidl, J. J. Use of the promoter fusion transposon Tn5 lac to identify mutations in *Bordetella pertussis* vir-regulated genes. *Infect. Immun.* **57**, 2674–2682 (1989).
 73. LACEY, B. W. Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *J. Hyg.* **58**, 57–93 (1951).
 74. Stibitz, S., Aaronson, W., Monack, D. & Falkow, S. Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature* **338**, 266–269 (1989).
 75. Coote, J. G. Antigenic switching and pathogenicity: Environmental effects on virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2493–2503 (1991).
 76. Arico, B., Scarlato, V., Monack, D. M., Falkow, S. & Rappuoli, R. Structural and genetic analysis of the bvg locus in *Bordetella* species. *Mol. Microbiol.* **5**, 2481–2491 (1991).
 77. Armstrong, S. K. & Parker, C. D. Surface proteins of *Bordetella pertussis*: Comparison of virulent and avirulent strains and effects of phenotypic modulation. *Infect. Immun.* **54**, 308–314 (1986).
 78. Cotter, P. A. & Jones, A. M. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. **11**, 367–373 (2003).
 79. De Tejada, G. M. *et al.* Neither the Bvg- phase nor the vrg6 locus of *Bordetella pertussis* is required for respiratory infection in mice. *Infect. Immun.* **66**, 2762–2768 (1998).
 80. Hewlett, E. L. *et al.* Pertussis pathogenesis - what we know and what we don't know. *J. Infect. Dis.* **209**, 982–985 (2014).
 81. Melvin, J. A., Scheller, E. V., Miller, J. F. & Cotter, P. A. *Bordetella pertussis* pathogenesis: Current and future challenges. *Nature Reviews Microbiology* vol. 12 274–288 (2014).
 82. Coutte, L. *et al.* Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. *J. Exp. Med.* **197**, 735–742 (2003).
 83. Abramson, T., Kedem, H. & Relman, D. A. Modulation of the NF- κ B pathway by *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *PLoS ONE* vol. 3 (2008).
 84. Inatsuka, C. S., Julio, S. M. & Cotter, P. A. *Bordetella* filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18578–18583 (2005).

85. Knight, J. B. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant filamentous haemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Clin. Exp. Immunol.* **144**, 543–551 (2006).
86. Mooi, F. R. *et al.* Characterization of fimbrial subunits from *Bordetella* species. *Microb. Pathog.* **2**, 473–484 (1987).
87. Geuijen, C. A. W., Willems, R. J. L. & Mooi, F. R. The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infect. Immun.* **64**, 2657–2665 (1996).
88. Geuijen, C. A. W. *et al.* Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect. Immun.* **65**, 4222–4228 (1997).
89. Henderson, I. A. N. R. & Nataro, J. P. Virulence Functions of Autotransporter Proteins. *Infect. Immun.* **69**, 1231–1243 (2001).
90. Finn, T. M. & Stevens, L. A. Tracheal colonization factor : a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol. Microbiol.* **16**, 625–634 (1995).
91. Nicosia, A. *et al.* Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: Operon structure and gene duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4631–4635 (1986).
92. Munoz, J. J., Arai, H., Bergman, R. K. & Sadowski, P. L. Biological activities of crystalline pertussigen from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **33**, 820–826 (1981).
93. Guiso, N. *Bordetella* Adenylate Cyclase-Hemolysin Toxins. *Toxins (Basel)*. **9**, (2017).
94. Khelef, N., Sakamoto, H. & Guiso, N. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. 227–235 (1992).
95. Walker, K. E. & Weiss, A. A. Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the Genus *Bordetella*. *Infect. Immun.* **62**, 3817–3828 (1994).
96. Mills, K. H. G. Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect.* **3**, 655–677 (2001).
97. Carbonetti, N. H. Immunomodulation in the pathogenesis of *Bordetella pertussis* infection and disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **7**, 272–278 (2007).
98. O’Neill, L. A. J. How Toll-like receptors signal: What we know and what we don’t know. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 3–9 (2006).
99. Harvill, E. T. *et al.* Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect. Immun.* **68**, 6720–6728 (2000).
100. Elder, K. D. & Harvill, E. T. Strain-dependent role of BrkA during *Bordetella pertussis* infection of the murine respiratory tract. *Infect. Immun.* **72**, 5919–5924 (2004).
101. Pishko, E. J., Betting, D. J., Hutter, C. S. & Harvill, E. T. *Bordetella pertussis* acquires resistance to complement-mediated killing in vivo. *Infect. Immun.* **71**, 4936–4942 (2003).
102. Ghosh, P. Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 771–795 (2004).
103. Fedele, G., Bianco, M. & Maria, C. The Virulence Factors of *Bordetella pertussis* : Talented Modulators of Host Immune Response. (2013) doi:10.1007/s00005-013-0242-1.
104. Olin, P. *et al.* Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. *Lancet* **350**, 1569–1577 (1997).
105. Crowcroft, N. S. & Pebody, R. G. Recent developments in pertussis. *Lancet* **367**, 1926–1936 (2006).
106. Preston, A. *Bordetella pertussis*: The intersection of genomics and pathobiology. *Cmaj* **173**, 55–62 (2005).
107. Anderton, T. L., Maskell, D. J. & Preston, A. Ciliostasis is a key early event during colonization of canine tracheal tissue by *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology* **150**, 2843–2855 (2004).

108. Belcher, T., Dubois, V., Rivera-Millot, A., Loch, C. & Jacob-Dubuisson, F. Pathogenicity and virulence of *Bordetella pertussis* and its adaptation to its strictly human host. *Virulence* vol. 12 2608–2632 (2021).
109. Bottero, D. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical *Bordetella pertussis* strains. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 1490–1498 (2007).
110. van Gent, M. *et al.* Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998–2012. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 821–830 (2015).
111. Bart, M. J. *et al.* Global Population Structure and Evolution of *Bordetella pertussis* and Their Relationship with Vaccination. *MBio* **5**, (2014).
112. Lefrancq N, Bouchez V, Fernandes N, Barkoff A, Bosch T, Dalby T, Åkerlund T, Fabianova K, Vestrheim DF, Fry NK, González-López JJ, Gullsbj K, Habington A, He Q, Litt D, Martini H, Piérard D, Stefanelli P, Stegger M, Zavadilova J, Armatys N, Landier A, Gui, B. S. Spatial dynamics and vaccine-induced fitness changes of *Bordetella pertussis*. (2021).
113. Cassidy, P. *et al.* Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935–1999. *J. Infect. Dis.* **182**, 1402–1408 (2000).
114. Advani, A., Gustafsson, L., Åhrén, C., Mooi, F. R. & Hallander, H. O. Appearance of Fim3 and ptxP3-*Bordetella pertussis* strains, in two regions of Sweden with different vaccination programs. *Vaccine* **29**, 3438–3442 (2011).
115. Kallonen, T., Mertsola, J., Mooi, F. R. & He, Q. Rapid detection of the recently emerged *Bordetella pertussis* strains with the ptxP3 pertussis toxin promoter allele by real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 94–96 (2012).
116. Njamkepo, E., Rimlinger, F., Thiberge, S. & Guiso, N. Thirty-five years' experience with the whole-cell pertussis vaccine in France : vaccine strains analysis and immunogenicity *Œ.* **20**, 1290–1294 (2002).
117. Hegerle, N. & Guiso, N. Epidemiology of whooping cough and typing of. *Future Microbiol.* 25–28 (2013).
118. King, A. J. *et al.* Comparative genomic profiling of Dutch clinical *Bordetella pertussis* isolates using DNA microarrays: Identification of genes absent from epidemic strains. *BMC Genomics* **9**, 1–14 (2008).
119. Lam, C. *et al.* Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 626–633 (2014).
120. Barkoff, A. M. *et al.* Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates: Evidence of increased circulation in Europe, 1998 to 2015. *Eurosurveillance* **24**, 1–11 (2019).
121. Martin, S. W. *et al.* Pertactin-Negative *Bordetella pertussis* Strains : Evidence for a Possible Selective Advantage. *Clin. Infect. Dis.* **60**, 223–227 (2015).
122. Hegerle, N., Dore, G. & Guiso, N. Pertactin deficient *Bordetella pertussis* present a better fitness in mice immunized with an acellular pertussis vaccine. *Vaccine* **32**, 6597–6600 (2014).
123. Zeddeman, A. *et al.* Effect of FHA and Prn on *Bordetella pertussis* colonization of mice is dependent on vaccine type and anatomical site. *PLoS One* **15**, 1–13 (2020).
124. Kroes, M. M. *et al.* Naturally circulating pertactin-deficient *Bordetella pertussis* strains induce distinct gene expression and inflammatory signatures in human dendritic cells. *Emerg. Microbes Infect.* **10**, 1358–1368 (2021).
125. Prygiel, M. *et al.* Effectiveness of experimental and commercial pertussis vaccines in the elimination of *Bordetella pertussis* isolates with different genetic profiles in murine model. *Medical Microbiology and Immunology* vol. 210 251–262 (2021).
126. Safarchi, A. *et al.* Pertactin negative *Bordetella pertussis* demonstrates higher fitness under vaccine selection pressure in a mixed infection model. *Vaccine* **33**, 6277–6281 (2015).
127. Shapiro-Shapin, C. G. Pearl Kendrick, grace eldering, and the pertussis vaccine. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1273–1278 (2010).
128. Klein, N. P. Licensed pertussis vaccines in the United States: History and current state. *Hum. Vaccines Immunother.* **10**, 2684–2690 (2014).

129. Morgan, C. A. M. Comparison of Acellular and Whole-Cell Pertussis-Component DTP Vaccines. *Am. J. Dis. Child.* **144**, 41 (1990).
130. Romanus, V., Jonsell, R. & Bergquist, S. O. Pertussis in Sweden after the cessation of general immunization in 1979. *Pediatric Infectious Disease Journal* vol. 6 364–371 (1987).
131. Ström, J. Further Experience of Reactions, Especially of a Cerebral Nature, in Conjunction with Triple Vaccination: A Study Based on Vaccinations in Sweden 1959–65. *Br. Med. J.* **4**, 320–323 (1967).
132. Stewart, G. T. VACCINATION AGAINST WHOOPING-COUGH. Efficacy versus Risks. *Lancet* **309**, 234–237 (1977).
133. Kulenkampff, M., Schwartzman, J. S. & Wilson, J. Neurological complications of pertussis inoculation. *Arch. Dis. Child.* **49**, 46–49 (1974).
134. Fanget, N. Pertussis: a tale of two vaccines. *Nat. Res.* 2021 **341**, 512 (2020).
135. David, A. B. & Jalilian-marian, A. DTP : Drug manufacturers ' liability in vaccine - related injuries. *J. Leg. Med.* **7**, 187–233 (1986).
136. Sato, Y., Arai, H. & Suzuki, K. Leukocytosis promoting factor of Bordetella pertussis. III. Its identity with protective antigen. *Infect. Immun.* **9**, 801–810 (1974).
137. Sato, Y. & Sato, H. Development of acellular pertussis vaccines. *Biologicals* **27**, 61–69 (1999).
138. Cherry, J. D. 'Pertussis Vaccine Encephalopathy': It Is Time to Recognize It as the Myth That It Is. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **263**, 1679–1680 (1990).
139. Moore, D. L., Le Saux, N., Scheifele, D. & Halperin, S. A. Lack of evidence of encephalopathy related to pertussis vaccine: Active surveillance by IMPACT, Canada, 1993-2002. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**, 568–571 (2004).
140. Organization, W. H. Pertussis Vaccines: WHO position paper-August 2015. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 145–168 (2018).
141. Siegrist, C.-A. *et al.* Report from the SAGE Working Group on Pertussis vaccines 26 - - - 27 August 2014 meeting. 1–29 (2014).
142. Cherry, J. D. Pertussis in the preantibiotic and prevaccine era, with emphasis on adult pertussis. *Clin. Infect. Dis.* **28**, 107–111 (1999).
143. Chow, M. Y. K., Khandaker, G. & McIntyre, P. Global childhood deaths from pertussis: A historical review. *Clin. Infect. Dis.* **63**, S134–S141 (2016).
144. Roush, S. W. *et al.* Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States. *J. Am. Med. Assoc.* **298**, 2155–2163 (2007).
145. Gentile, Á. Infección por Bordetella pertussis. *Arch. Argent. Pediatr.* **108**, 78–81 (2010).
146. Hozbor, D. *et al.* Pertussis epidemiology in Argentina: trends over 2004-2007. *J. Infect.* **59**, 225–231 (2009).
147. Clark, T. A. Changing pertussis epidemiology: Everything old is new again. *J. Infect. Dis.* **209**, 978–981 (2014).
148. Falleiros Arlant, L. H. *et al.* Pertussis in Latin America: Epidemiology and control strategies. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **12**, 1265–1275 (2014).
149. Saadatian-Elahi, M. *et al.* Pertussis: Biology, epidemiology and prevention. in *Vaccine* vol. 34 5819–5826 (Elsevier Ltd, 2016).
150. Romanin, V. *et al.* Epidemiological situation of pertussis and strategies to control it: Argentina, 2002-2011. *Arch. argentinos pediatria* **112**, 413–420 (2014).
151. Hozbor, D. Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Pertussis. *Pertussis - Dis. Control Challenges* (2018) doi:10.5772/intechopen.72847.
152. Yeung, K. H. T., Duclos, P., Nelson, E. A. S. & Hutubessy, R. C. W. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study. *Lancet Infect. Dis.* **17**, 974–980 (2017).

153. WHO. The Immunological Basis for Immunization Series Module 4 : Pertussis Update 2009. (2009).
154. Cherry, J. D. Epidemic pertussis and acellular pertussis vaccine failure in the 21st century. *Pediatrics* **135**, 1130–1132 (2015).
155. Seth, W., Edwards, M., Decker, M. D. & Marie, H. Pertussis Infection in Adults With Persistent Cough. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **273**, 1044–1046 (1995).
156. Juarez, M. del V., Lucion, M. F., Areso, M. S. & Gentile, A. Enfermedad por Bordetella pertussis ¿Qué hacer ante una sospecha de coqueluche? *Rev. Hosp. Niños (B. Aires)* **60**, 71–77 (2018).
157. Koepke, R. *et al.* Estimating the effectiveness of tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccine (Tdap) for preventing pertussis: Evidence of rapidly waning immunity and difference in effectiveness by Tdap brand. *J. Infect. Dis.* **210**, 942–953 (2014).
158. Witt, M. A., Katz, P. H. & Witt, D. J. Unexpectedly limited durability of immunity following acellular pertussis vaccination in preadolescents in a north American outbreak. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 1730–1735 (2012).
159. Klein, N. P., Bartlett, J., Fireman, B., Rowhani-Rahbar, A. & Baxter, R. Comparative effectiveness of acellular versus whole-cell pertussis vaccines in teenagers. *Pediatrics* **131**, (2013).
160. Warfel, J. M., Zimmerman, L. I. & Merkel, T. J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 787–792 (2014).
161. Pawloski, L. C. *et al.* Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient Bordetella pertussis in the United States. *Clin. Vaccine Immunol.* **21**, 119–125 (2014).
162. Barkoff, A. M. *et al.* Appearance of Bordetella pertussis strains not expressing the vaccine antigen pertactin in Finland. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**, 1703 (2012).
163. Amirthalingam, G. *et al.* Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England : an observational study. *Lancet* **384**, 1521–1528 (2014).
164. Fabricius, G. *et al.* Pertussis epidemiology in Argentina : TRENDS after the introduction of maternal immunisation. *Epidemiol. Infect.* **146**, 858–866 (2018).
165. Abu Raya, B., Edwards, K. M., Scheifele, D. W. & Halperin, S. A. Pertussis and influenza immunisation during pregnancy: a landscape review. *The Lancet Infectious Diseases* vol. 17 e209–e222 (2017).
166. Maertens, K. *et al.* Pertussis vaccination during pregnancy in Belgium: Follow-up of infants until 1 month after the fourth infant pertussis vaccination at 15 months of age. *Vaccine* **34**, 3613–3619 (2016).
167. Warfel, J. M., Papin, J. F., Wolf, R. F., Zimmerman, L. I. & Merkel, T. J. Maternal and neonatal vaccination protects newborn baboons from pertussis infection. *J. Infect. Dis.* **210**, 604–610 (2014).
168. WHO. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. **90**, 433–460 (2015).
169. Causey, K. *et al.* Estimating global and regional disruptions to routine childhood vaccine coverage during the COVID-19 pandemic in 2020: a modelling study. *The Lancet* vol. 398 522–534 (2021).
170. Gaythorpe, K. *et al.* Impact of covid-19-related disruptions to measles, meningococcal a, and yellow fever vaccination in 10 countries. *Elife* **10**, 1–34 (2021).
171. Lassi, Z. S., Naseem, R., Salam, R. A., Siddiqui, F. & Das, J. K. The impact of the COVID-19 pandemic on immunization campaigns and programs: a systematic review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **18**, 1–19 (2021).
172. Ross, P. J. *et al.* Relative Contribution of Th1 and Th17 Cells in Adaptive Immunity to Bordetella pertussis: Towards the Rational Design of an Improved Acellular Pertussis Vaccine. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
173. Mills, K. H. G. *et al.* Cell-Mediated Immunity to Bordetella pertussis: Role of Th1 Cells in Bacterial Clearance in a Murine Respiratory Infection Model. *INFECTION AND IMMUNITY* (1993).
174. Brummelman, J., Wilk, M. M., Han, W. G. H., van Els, C. A. C. M. & Mills, K. H. G. Roads to the development of

- improved pertussis vaccines paved by immunology. *Pathogens and disease* vol. 73 ftv067 (2015).
175. Higgs, R., Higgins, S. C., Ross, P. J. & Mills, K. H. G. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunology* vol. 5 485–500 (2012).
 176. Carbonetti, N. H., Artamonova, G. V., Van Rooijen, N. & Ayala, V. I. Pertussis toxin targets airway macrophages to promote *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. *Infect. Immun.* **75**, 1713–1720 (2007).
 177. Stumbles, P. A. *et al.* Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J. Exp. Med.* **188**, 2019–2031 (1998).
 178. Jahnsen, F. L. *et al.* Accelerated Antigen Sampling and Transport by Airway Mucosal Dendritic Cells following Inhalation of a Bacterial Stimulus. *J. Immunol.* **177**, 5861–5867 (2006).
 179. Lambrecht, B. N. Alveolar Macrophage in the Driver's Seat. *Immunity* **24**, 366–368 (2006).
 180. Lamberti, Y. A., Hayes, J. A., Perez Vidakovics, M. L., Harvill, E. T. & Rodriguez, M. E. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect. Immun.* **78**, 907–913 (2010).
 181. Lamberti, Y., Gorgojo, J., Massillo, C. & Rodriguez, M. E. *Bordetella pertussis* entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. *Pathog. Dis.* **69**, 194–204 (2013).
 182. Wang, Z. Y. *et al.* Induction of dendritic cell maturation by pertussis toxin and its B subunit differentially initiate Toll-like receptor 4-dependent signal transduction pathways. *Exp. Hematol.* **34**, 1115–1124 (2006).
 183. Nishida, M. *et al.* Pertussis toxin up-regulates angiotensin type 1 receptors through toll-like receptor 4-mediated Rac activation. *J. Biol. Chem.* **285**, 15268–15277 (2010).
 184. Ryan, M., McCarthy, L., Rappuoli, R., Mahon, B. P. & Mills, K. H. G. Pertussis toxin potentiates T(h)1 and T(h)2 responses to co-injected antigen: Adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int. Immunol.* **10**, 651–662 (1998).
 185. Ausiello, C. M. *et al.* Native and genetically inactivated pertussis toxins induce human dendritic cell maturation and synergize with lipopolysaccharide in promoting T helper type 1 responses. *J. Infect. Dis.* **186**, 351–360 (2002).
 186. Tonon, S. *et al.* *Bordetella pertussis* toxin induces the release of inflammatory cytokines and dendritic cell activation in whole blood: Impaired responses in human newborns. *Eur. J. Immunol.* **32**, 3118–3125 (2002).
 187. Higgins, S. C. *et al.* Toll-Like Receptor 4-Mediated Innate IL-10 Activates Antigen-Specific Regulatory T Cells and Confers Resistance to *Bordetella pertussis* by Inhibiting Inflammatory Pathology. *J. Immunol.* **171**, 3119–3127 (2003).
 188. Mann, P. B. *et al.* Comparative toll-like receptor 4-mediated innate host defense to *Bordetella* infection. *Infect. Immun.* **73**, 8144–8152 (2005).
 189. Higgins, S. C., Jarnicki, A. G., Lavelle, E. C. & Mills, K. H. G. TLR4 Mediates Vaccine-Induced Protective Cellular Immunity to *Bordetella pertussis* : Role of IL-17-Producing T Cells. *J. Immunol.* **177**, 7980–7989 (2006).
 190. Banus, S. *et al.* The role of Toll-like receptor-4 in pertussis vaccine-induced immunity. *BMC Immunol.* **9**, 21 (2008).
 191. Dunne, A. *et al.* Inflammasome Activation by Adenylate Cyclase Toxin Directs Th17 Responses and Protection against *Bordetella pertussis*. *J. Immunol.* **185**, 1711–1719 (2010).
 192. Hickey, F. B., Brereton, C. F. & Mills, K. H. G. Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* inhibits TLR-induced IRF-1 and IRF-8 activation and IL-12 production and enhances IL-10 through MAPK activation in dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 234–243 (2008).
 193. Zachariadis, O., Cassidy, J. P., Brady, J. & Mahon, B. P. $\gamma\delta$ T cells regulate the early inflammatory response to *Bordetella pertussis* infection in the murine respiratory tract. *Infect. Immun.* **74**, 1837–1845 (2006).
 194. Misiak, A., Wilk, M. M., Raverdeau, M. & Mills, K. H. G. IL-17-Producing Innate and Pathogen-Specific Tissue Resident Memory $\gamma\delta$ T Cells Expand in the Lungs of *Bordetella pertussis* -Infected Mice. *J. Immunol.* **198**, 363–374 (2017).
 195. Ribot, J. C., Lopes, N. & Silva-Santos, B. $\gamma\delta$ T cells in tissue physiology and surveillance. *Nat. Rev. Immunol.* (2020).

196. Andreasen, C. & Carbonetti, N. H. Role of neutrophils in response to bordetella pertussis infection in mice. *Infect. Immun.* **77**, 1182–1188 (2009).
197. Eby, J. C., Gray, M. C. & Hewlett, E. L. Cyclic AMP-mediated suppression of neutrophil extracellular trap formation and apoptosis by the Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. *Infect. Immun.* **82**, 5256–5269 (2014).
198. Eby, J. C., Hoffman, C. L., Gonyar, L. a. & Hewlett, E. L. Review of the neutrophil response to *Bordetella pertussis* infection. *Pathog. Dis.* **73**, ftv081 (2015).
199. Byrne, P., McGuirk, P., Todryk, S. & Mills, K. H. G. Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with Bordetella pertussis associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2579–2588 (2004).
200. Kroes, M. M. *et al.* Activation of human NK cells by Bordetella pertussis requires inflammasome activation in macrophages. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
201. Barbic, J., Leef, M. F., Burns, D. L. & Shahin, R. D. Role of gamma interferon in natural clearance of Bordetella pertussis infection. *Infect. Immun.* **65**, 4904–4908 (1997).
202. Mahon, B. B. P., Sheahan, B. J., Griffin, F., Murphy, G. & Mills, K. H. G. Atypical Disease after Bordetella pertussis Respiratory Infection of Mice with Targeted Disruptions of Interferon Receptor or Immunoglobulin u Chain Genes. *J. Exp. Med.* **186**, (1997).
203. Kirimanjeswara, G. S., Mann, P. B. & Harvill, E. T. Role of antibodies in immunity to Bordetella infections. *Infect. Immun.* **71**, 1719–1724 (2003).
204. Leef, M., Elkins, K. L., Barbic, J. & Shahin, R. D. *Protective Immunity to Bordetella pertussis Requires Both B Cells and CD4 T Cells for Key Functions Other than Specific Antibody Production. The Journal of Experimental Medicine* • vol. 191 <http://www.jem.org/cgi/current/full/191/11/1841> (2000).
205. Linton, P.-J., Harbertson, J. & Bradley, L. M. A Critical Role for B Cells in the Development of Memory CD4 Cells. *J. Immunol.* **165**, 5558–5565 (2000).
206. Warfel, J. M. & Merkel, T. J. Bordetella pertussis infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunol.* **6**, 787–796 (2013).
207. Redhead, K. *et al.* *Effective Immunization against Bordetella pertussis Respiratory Infection in Mice Is Dependent on Induction of Cell-Mediated Immunity. INFECTION AND IMMUNITY* (1993).
208. Stenger, R. M. *et al.* Impaired long-term maintenance and function of Bordetella pertussis specific B cell memory. *Vaccine* **28**, 6637–6646 (2010).
209. Raeven, R. H. M. *et al.* Immunoproteomic Profiling of Bordetella pertussis Outer Membrane Vesicle Vaccine Reveals Broad and Balanced Humoral Immunogenicity. *Journal of Proteome Research* vol. 14 2929–2942 (2015).
210. Brummelman, J. *et al.* Modulation of the CD4+ T cell response after acellular pertussis vaccination in the presence of TLR4 ligation. *Vaccine* **33**, 1483–1491 (2015).
211. Zanaboni, E., Arato, V., Pizza, M., Seubert, A. & Leuzzi, R. A novel high-throughput assay to quantify the vaccine-induced inhibition of Bordetella pertussis adhesion to airway epithelia. *BMC Microbiol.* **16**, 1–7 (2016).
212. Wilk, M. M. *et al.* Lung CD4 Tissue-Resident Memory T Cells Mediate Adaptive Immunity Induced by Previous Infection of Mice with Bordetella pertussis. (2017) doi:10.4049/jimmunol.1602051.
213. Wilk, M. M. *et al.* Immunization with whole cell but not acellular pertussis vaccines primes CD4 T RM cells that sustain protective immunity against nasal colonization with Bordetella pertussis. **8**, (2019).
214. Darrah, P. A. *et al.* Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major. *Nat. Med.* **13**, 843–850 (2007).
215. Nikhil S. Joshi, Weiguo Cui, Anmol Chandele, Heung Kyu Lee, David R. Urso, James Hagman, Laurent Gapin, and S. M. K. Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8(+) T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* **27**, 281–295 (2007).

216. Gattinoni, L., Klebanoff, C. A. & Restifo, N. P. Paths to stemness: Building the ultimate antitumour T cell. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 671–684 (2012).
217. Tubo, N. J. & Jenkins, M. K. TCR signal quantity and quality in CD4 + T cell differentiation. *Trends Cell Biol.* **35**, 591–596 (2014).
218. Storsaeter, J., Hallander, H. O., Gustafsson, L. & Olin, P. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* **16**, 1907–1916 (1998).
219. Cherry, J. D., Gornbein, J., Heininger, U. & Stehr, K. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* **16**, 1901–1906 (1998).
220. Ausiello, C. M. *et al.* T-cell immune response assessment as a complement to serology and intranasal protection assays in determining the protective immunity induced by acellular pertussis vaccines in mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 637–642 (2003).
221. Cassone, A., Mastrantonio, P. & Ausiello, C. M. Are Only Antibody Levels Involved in the Protection against Pertussis in Acellular Pertussis Vaccine Recipients? *J. Infect. Dis.* **182**, 1575–1576 (2000).
222. Giacomini, E., Urbani, F., Ausiello, C. M. & Luzzati, A. L. Induction of a specific antibody response to *Bordetella pertussis* antigens in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *J. Med. Microbiol.* **48**, 1081–1086 (1999).
223. Plotkin, S. A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 1055–1065 (2010).
224. Plotkin, S. A. & Gilbert, P. B. Nomenclature for immune correlates of protection after vaccination. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 1615–1617 (2012).
225. Storsaeter, J., Hallander, H. O., Gustafsson, L. & Olin, P. Low levels of antipertussis antibodies plus lack of history of pertussis correlate with susceptibility after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* **21**, 3542–3549 (2003).
226. Barkoff, A. M., Knuutila, A., Mertsola, J. & He, Q. Evaluation of anti-PT antibody response after pertussis vaccination and infection: The importance of both quantity and quality. *Toxins (Base)*. **13**, (2021).
227. Fedele, G., Cassone, A. & Ausiello, C. M. *ari.* T-cell immune responses to *Bordetella pertussis* infection and vaccination. *Pathogens and disease* vol. 73 (2015).
228. Plotkin, S. A. Composition of pertussis vaccine given to infants determines long-term T cell polarization. *J. Clin. Invest.* **128**, 3742–3744 (2018).
229. Ryan, M. *et al.* *Bordetella pertussis* respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 T helper cells. *J. Immunol.* **175**, 1246–1250 (1997).
230. Lambert, L. C. Pertussis vaccine trials in the 1990s. *J. Infect. Dis.* **209**, (2014).
231. Ryan, M. *et al.* *Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children.* *Immunology* vol. 93 (1998).
232. Ausiello, C. M. *et al.* Cell-mediated immune responses in four-year-old children after primary immunization with acellular pertussis vaccines. *Infect. Immun.* **67**, 4064–4071 (1999).
233. Mascart, F. *et al.* Modulation of the infant immune responses by the first pertussis vaccine administrations. *Vaccine* **25**, 391–398 (2007).
234. Schure, R. M. *et al.* T-cell responses before and after the fifth consecutive acellular pertussis vaccination in 4-year-old Dutch children. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**, 1879–1886 (2012).
235. Ya, E. J. R. N., Kjellman, N. I. M. & Mills, K. H. G. Booster immunization of children with an acellular pertussis vaccine enhances Th2 cytokine production and serum IgE responses against pertussis toxin but not against common allergens. (2000).
236. Mascart, F. *et al.* *Bordetella pertussis* Infection in 2-Month-Old Infants Promotes Type 1 T Cell Responses . *J. Immunol.* **170**, 1504–1509 (2003).

237. Rowe, J. *et al.* Th2-Associated Local Reactions to the Acellular Diphtheria-Tetanus-Pertussis Vaccine in 4- to 6-Year-Old Children. *Infect. Immun.* **73**, 8130–8135 (2005).
238. Vermeulen, F. *et al.* Cellular Immune Responses of Preterm Infants after Vaccination with Whole-Cell or Acellular Pertussis Vaccines. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 258–262 (2010).
239. Hendriks, L. H. *et al.* Different IgG-subclass distributions after whole-cell and acellular pertussis infant primary vaccinations in healthy and pertussis infected children. *Vaccine* **29**, 6874–6880 (2011).
240. Liko, J., Robison, S. G. & Cieslak, P. R. Priming with Whole-Cell versus Acellular Pertussis Vaccine. *N Engl J Med.* **368**, 581–582 (2013).
241. Sheridan, S. L., Ware, R. S., Grimwood, K. & Lambert, S. B. Number and Order of Whole Cell Pertussis Vaccines in Infancy and Disease Protection. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **308**, 454–456 (2012).
242. Eberhardt, C. S. & Siegrist, C. A. What is wrong with pertussis vaccine immunity? Inducing and recalling vaccine-specific immunity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, (2017).
243. Burdin, N., Handy, L. K. & Plotkin, S. A. What is wrong with pertussis vaccine immunity?: The problem of waning effectiveness of pertussis vaccines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, (2017).
244. Gilberg, S. *et al.* Evidence of Bordetella pertussis Infection in Adults Presenting with Persistent Cough in a French Area with Very High Whole-Cell Vaccine Coverage. *J. Infect. Dis.* **186**, 415–418 (2002).
245. Cherry, J. D. The Science and Fiction of the “Resurgence” of Pertussis. *Pediatrics* **112**, 405–406 (2003).
246. von Konig, C. H. W., Halperin, S., Riffelmann, M. & Guiso, N. Pertussis of adults and infants. *Lancet* **2**, 744–750 (2002).
247. Wendelboe, A. M., Van Rie, A., Salmaso, S. & Englund, J. A. Duration of Immunity Against Pertussis After Natural Infection or Vaccination. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, 58–61 (2005).
248. Diavatopoulos, D. A. *et al.* PERISCOPE: road towards effective control of pertussis. *Lancet Infect. Dis.* **19**, e179–e186 (2019).
249. Fine, P. E. M. & Clarkson, J. A. Reflections on the Efficacy of Pertussis Vaccines. *Rev. Infect. Dis.* **9**, (1987).
250. Cherry, J. D. Epidemiological, Clinical, and Laboratory Aspects of Pertussis in Adults. *Clin. Infect. Dis.* **28**, 112–117 (1999).
251. Salmaso, S. *et al.* Sustained Efficacy During the First 6 Years of Life of 3-Component Acellular Pertussis Vaccines Administered in Infancy: The Italian Experience. *Pediatrics* **108**, (2001).
252. Mcalister, S. M. *et al.* An observational study of antibody responses to a primary or subsequent pertussis booster vaccination in Australian healthcare workers. *Vaccine* **39**, 1642–1651 (2021).
253. Paradowska-Stankiewicz, I. *et al.* Duration of protection against Bordetella pertussis infection elicited by whole-cell and acellular vaccine priming in Polish children and adolescents. *Vaccine* **39**, 6067–6073 (2021).
254. Bisgard, K. M. *et al.* Pertussis Vaccine Effectiveness Among Children 6 to 59 Months of Age in the United States, 1998–2001. *Pediatrics* **116**, 1998–2001 (2005).
255. van der Lee, S., Hendriks, L. H., Sanders, E. A. M., Berbers, G. A. M. & Buisman, A. M. Whole-cell or acellular pertussis primary immunizations in infancy determines adolescent cellular immune profiles. *Front. Immunol.* **9**, 1–10 (2018).
256. Schure, R.-M., Sanders, E. A. M. & Berbers, G. A. M. Differential T- and B-Cell Responses to Pertussis in Acellular Vaccine- Primed versus Whole-Cell Vaccine-Primed Children 2 Years after. *Clin. Vaccine Immunol.* **20**, 1388–1395 (2013).
257. Da Silva Antunes, R. *et al.* Th1/Th17 polarization persists following whole-cell pertussis vaccination despite repeated acellular boosters. *J. Clin. Invest.* **128**, 3853–3865 (2018).
258. Schwartz, K. L. *et al.* Effectiveness of pertussis vaccination and duration of immunity. *CMAJ* **188**, 399–406 (2016).

259. Klein, N. P., Barlett, J., Rowhani-Rahbar, A., Fireman, B. & Baxter, R. Waning Protection after Fifth Dose of Acellular Pertussis Vaccine in Children. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1012–1019 (2012).
260. Klein, N. P., Bartlett, J., Fireman, B. & Baxter, R. Waning Tdap Effectiveness in Adolescents. *Pediatrics* **137**, (2016).
261. Mills, K. H. G., Ross, P. J., Allen, A. C. & Wilk, M. M. Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis? *Trends Microbiol.* **22**, 49–52 (2014).
262. Allen, A. C. & Mills, K. H. G. Improved pertussis vaccines based on adjuvants that induce cell-mediated immunity. *Expert Rev. Vaccines* **13**, 1253–1264 (2014).
263. Rappuoli, R. The Vaccine Containing Recombinant Pertussis Toxin Induces Early and Long-Lasting Protection. *Biologicals* **27**, 99–102 (1999).
264. Podda, A., Titone, L., Marsili, I. & Rappuoli, R. Immunogenicity of an acellular pertussis vaccine composed of genetically inactivated pertussis toxin combined with filamentous hemagglutinin and pertactin in infants and children. *Clin. Lab. Obs.* 1–4 (1993).
265. Buasri, W. *et al.* Construction of Bordetella pertussis strains with enhanced production of genetically-inactivated Pertussis Toxin and Pertactin by unmarked allelic exchange. *BMC Microbiol.* **12**, (2012).
266. Sirivichayakul, C., Chanthavanich, P., Limkittikul, K., Siegrist, C. & Wijagkanalan, W. Safety and immunogenicity of a combined Tetanus, Diphtheria, recombinant acellular Pertussis vaccine (TdaP) in healthy Thai adults. *Hum. Vaccines Immunother.* **13**, 136–143 (2017).
267. Pulendran, B., S. Arunachalam, P. & O’Hagan, D. T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 454–475 (2021).
268. Geurtsen, J. *et al.* Lipopolysaccharide analogs improve efficacy of acellular pertussis vaccine and reduce type I hypersensitivity in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 821–829 (2007).
269. Dunne, A. *et al.* A novel TLR2 agonist from Bordetella pertussis is a potent adjuvant that promotes protective immunity with an acellular pertussis vaccine. *Mucosal Immunol.* 1–11 (2014) doi:10.1038/mi.2014.93.
270. Allen, A. C. *et al.* Sustained protective immunity against Bordetella pertussis nasal colonization by intranasal immunization with a vaccine-adjuvant combination that induces IL-17-secreting T RM cells. *Mucosal Immunol.* **11**, 1763–1776 (2018).
271. Kaparakis-Liaskos, M. & Ferrero, R. L. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews Immunology* vol. 15 375–387 (2015).
272. Toyofuku, M., Nomura, N. & Eberl, L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 13–24 (2019).
273. Jan, A. T. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: A perspective update. *Frontiers in Microbiology* vol. 8 (2017).
274. Mashburn-Warren, L., Mclean, R. J. C. & Whiteley, M. Gram-negative outer membrane vesicles: Beyond the cell surface. *Geobiology* vol. 6 214–219 (2008).
275. Gould, S. B., Garg, S. G. & Martin, W. F. Bacterial vesicle secretion and the evolutionary origin of the 1 eukaryotic endomembrane system 2 3 4. *Trends Microbiol.* **xx**, 1–10 (2016).
276. Hozbor, D. *et al.* Release of outer membrane vesicles from Bordetella pertussis. *Curr. Microbiol.* **38**, 273–278 (1999).
277. Asensio, C. J. A. *et al.* Outer membrane vesicles obtained from Bordetella pertussis Tohama expressing the lipid a deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate. *Vaccine* **29**, 1649–1656 (2011).
278. Hozbor, D. F. Outer membrane vesicles : an attractive candidate for pertussis vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **0**, (2016).
279. Ormazábal, M. *et al.* Characterization of the key antigenic components of pertussis vaccine based on outer membrane vesicles. *Vaccine* **32**, 6084–6090 (2014).

280. Díaz, S. *et al.* La pandemia COVID-19 es el resultado del modelo de apropiación de la naturaleza. 81–100 (2020).
281. Council, I. C. of the M. R. VACCINATION against whooping-cough; relation between protection in children and results of laboratory tests; a report to the Whooping-cough. *Br. Med. J.* **2**, 454–462 (1956).
282. Ad Hoc Group For The Study Of Pertussis Vaccines. Placebo-Controlled Trial of Two Acellular Pertussis Vaccines in Sweden-Protective Efficacy and Adverse Events. *The Lancet* vol. 331 349–355 (1988).
283. Bruss, J. B. & Siber, G. R. Protective effects of pertussis immunoglobulin (P-IGIV) in the aerosol challenge model. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**, 464–470 (1999).
284. Warfel, J. M., Beren, J., Kelly, V. K., Lee, G. & Merkel, T. J. Nonhuman primate model of pertussis. *Infect. Immun.* **80**, 1530–1536 (2012).
285. Warfel, J. M. & Merkel, T. J. The baboon model of pertussis: Effective use and lessons for pertussis vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **13**, 1241–1252 (2014).
286. Deligne, C., Milcent, B., Josseaume, N., Teillaud, J. L. & Sibérial, S. Impact of depleting therapeutic monoclonal antibodies on the host adaptive immunity: A bonus or a malus? *Front. Immunol.* **8**, 1–11 (2017).
287. Gaillard, M. E. *et al.* Acellular pertussis vaccine based on outer membrane vesicles capable of conferring both long-lasting immunity and protection against different strain genotypes. *Vaccine* **32**, 931–937 (2014).
288. Guiso, N., Capiou, C., Carletti, G., Poolman, J. & Hauser, P. Intranasal murine model of Bordetella pertussis infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine* **17**, 2366–2376 (1999).
289. Bali, P. & Rafi, A. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* **12**, 509–517 (2011).
290. Pollard, A. J. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, (2021).
291. Wilk, M. M., Mills, K. H. G. & Mckinstry, K. K. CD4 T RM Cells Following Infection and Immunization : Implications for More Effective Vaccine Design. **9**, 1–8 (2018).
292. Casadevall, A. & Pirofski, L. Exploiting the Redundancy in the Immune System : Vaccines Can Mediate Protection by Eliciting ‘ Unnatural ’ Immunity. **197**, 6–9 (2003).
293. Fischer, A. & Rausell, A. Primary immunodeficiencies suggest redundancy within the human immune system. *Sci. Immunol.* **1**, 1–10 (2016).
294. Mantovani, A. Redundancy and Robustness Versus Division of Labour and Specialization in Innate Immunity. *Semin. Immunol.* **36**, 28–30 (2018).
295. Nish, S. A. & Medzhitov, R. Host Defense Pathways: role of redundancy and compensation in infectious disease phenotypes. *Immunity* **34**, 629–636 (2011).
296. Matzinger, P. & Kamala, T. Tissue-based class control: The other side of tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 221–230 (2011).
297. Ferwerda, G., Meyer-Wentrup, F., Kullberg, B.-J., Netea, M. G. & Ademas, G. J. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell. Immunol.* **10**, 2058–2066 (2008).
298. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–712 (1999).
299. Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L. & Lefranc, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science (80-)*. **291**, 2413–2417 (2001).
300. Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T. & Jenkins, M. K. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* **410**, 101–105 (2001).
301. Gebhardt, T. *et al.* Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* **10**, 524–530 (2009).

302. Masopust, D. *et al.* Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J. Exp. Med.* **207**, 553–564 (2010).
303. Teijaro, J. R. *et al.* Cutting Edge: Tissue-Retentive Lung Memory CD4 T Cells Mediate Optimal Protection to Respiratory Virus Infection. *J. Immunol.* **187**, 5510–5514 (2011).
304. Jiang, X., Clark, R., Liu, L. & Kupper, T. S. Skin infection generates non-migratory memory CD8+ TRM cells providing global skin immunity. *Nat Rev Microbiol* **483**, 227–231 (2012).
305. Klonowski, K. D. *et al.* Dynamics of blood-borne CD8 memory T cell migration in vivo. *Immunity* **20**, 551–562 (2004).
306. Steinert, E. *et al.* Quantifying memory CD8 T cells reveals regionalization of immunosurveillance. *Cell* **161**, 737–749 (2016).
307. Takamura, S. *et al.* Specific niches for lung-resident memory CD8+ T cells at the site of tissue regeneration enable CD69-independent maintenance. *J. Exp. Med.* **213**, 3057–3073 (2016).
308. Anderson, K. G. *et al.* Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nat. Protoc.* **9**, 209–222 (2014).
309. Zens, K. D., Chen, J. K. & Farber, D. L. Vaccine-generated lung tissue-resident memory T cells provide heterosubtypic protection to influenza infection. *JCI Insight* **1**, 1–12 (2019).
310. Flórido, M. *et al.* Pulmonary immunization with a recombinant influenza A virus vaccine induces lung-resident CD4 + memory T cells that are associated with protection against tuberculosis. *Mucosal Immunology* vol. 11 1743–1752 (2018).
311. Malik, B. T. *et al.* Resident memory T cells in skin mediate durable immunity to melanoma. *Sci. Immunol* **2**, (2017).
312. Turner, D. L. *et al.* Biased Generation and In Situ Activation of Lung Tissue-Resident Memory CD4 T Cells in the Pathogenesis of Allergic Asthma. *J. Immunol.* **200**, 1561–1569 (2018).
313. Clark, R. A. *et al.* Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. *Sci. Transl. Med* **4**, (2012).
314. Zuber, J. *et al.* Bidirectional intra-graft alloreactivity drives the repopulation of human intestinal allografts and correlates with clinical outcome. *Sci. Immunol* **1**, (2016).
315. Snyder, M. E. *et al.* Generation and persistence of human tissue-resident memory T cells in lung transplantation. *Sci. Immunol* **4**, (2019).
316. Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I. & Kagan, J. C. *Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective.* (2015). doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112240. *Innate*.
317. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : update on Toll-like receptors. *Nat. Publ. Gr.* **11**, 373–384 (2010).
318. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* **16**, 343–353 (2015).
319. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252 (1998).
320. Cella, M., Engering, A. & Pinet, V. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**, 782–787 (1997).
321. Cycling, C. *et al.* Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* **657**, 655–657 (1997).
322. Caux, B. C. *et al.* Activation of Human Dendritic Cells through CD40 Cross-linking. **180**, (1994).
323. Caetano, B. *et al.* In Vivo Microbial Stimulation Induces Rapid CD40 Ligand – independent Production of Interleukin 12 by Dendritic Cells and their Redistribution to T Cell Areas. **186**, (1997).

324. Cyster, J. G. & Allen, C. D. C. Review B Cell Responses : Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* **177**, 524–540 (2019).
325. Kagan, J. C., Magupalli, V. G. & Wu, H. SMOCs: supramolecular organizing centres that control innate immunity. *Nat. Publ. Gr.* 1–6 (2014) doi:10.1038/nri3757.
326. Arend, W. P. IL-1 , IL-18 , and IL-33 families of cytokines. *Immunol. Rev.* 20–38 (2008).
327. Brough, D. & Rothwell, N. J. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin- 1 β is cytosolic and precedes cell death. 772–781 (2007) doi:10.1242/jcs.03377.
328. Keller, M., Rüegg, A., Werner, S. & Beer, H. D. Active Caspase-1 Is a Regulator of Unconventional Protein Secretion. *Cell* **132**, 818–831 (2008).
329. Olaf Groß,1,3,5,* Amir S. Yazdi,1,4,5 Christina J. Thomas,1,3 Mark Masin,1 Leonhard X. Heinz,1 Greta Guarda,1 Manfredo Quadroni,2 Stefan K. Drexler, 1 and Jurg Tschopp. Inflammasome activators induce interleukin-1 α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. Tschopp Immunity. 2012.pdf. *Cell* (2012).
330. Martinon, F., Burns, K. & Burns, T. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL-1 β . *Cell* **10**, 417–426 (2002).
331. Zamboni, D. S. *et al.* The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of Legionella pneumophila infection. **7**, (2006).
332. Miao, E. A. *et al.* Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nat. Immunol.* **7**, 569–575 (2006).
333. Fernandes-Alnemri, T., Yu, J. W., Datta, P., Wu, J. & Alnemri, E. S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* **458**, 509–513 (2009).
334. Hornung, V. *et al.* AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **458**, 514–518 (2009).
335. Bürckstümmer, T. *et al.* An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat. Immunol.* **10**, 266–272 (2009).
336. Xu, H. *et al.* Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature* **513**, 237–241 (2014).
337. Hoss, F., Rodriguez-Alcazar, J. F. & Latz, E. Assembly and regulation of ASC specks. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 1211–1229 (2017).
338. Stutz, A., Horvath, G. L., Monks, B. G. & Latz, E. ASC Speck Formation as a Readout for Inflammasome Activation. in 91–101 (2013). doi:10.1007/978-1-62703-523-1_8.
339. Shi, J. *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* (2015) doi:10.1038/nature15514.
340. Kayagaki, N. *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. (2015) doi:10.1038/nature15541.
341. He, W. T. *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res.* **25**, 1285–1298 (2015).
342. Liu, X. *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* **535**, 153–158 (2016).
343. Ding, J. *et al.* Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* **535**, 111–116 (2016).
344. Aglietti, R. A. *et al.* GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *PNAS* **113**, (2016).

345. Sborgi, L. *et al.* GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J.* **35**, 1766–1778 (2016).
346. Fink, S. L. & Cookson, B. T. MINIREVIEW Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* **73**, 1907–1916 (2005).
347. Fink, S. L. & Cookson, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **8**, 1812–1825 (2006).
348. Andrews, N. W., de Almeida, P. E. & Corrotte, M. Damage Control Cellular Mechanisms of Plasma Membrane Repair. *Trends Cell Biol.* **24**, 734–742 (2014).
349. Tam, C. *et al.* Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair and plasma membrane repair. *J. Cell Biol.* **189**, 1027–1038 (2010).
350. Joaquina, A. *et al.* ESCRT Machinery Is Required for Plasma Membrane Repair. *Science (80-.)*. **343**, (2014).
351. Scheffer, L. L. *et al.* Mechanism of Ca²⁺-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
352. Evavold, C. L. *et al.* The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity* **48**, 35–44.e6 (2018).
353. Heilig, R. *et al.* The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 β secretion in mice. *Eur. J. Immunol.* **48**, 584–592 (2018).
354. Broz, P., Pelegrín, P. & Shao, F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* (2019) doi:10.1038/s41577-019-0228-2.
355. Chen, K. W. *et al.* Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. *Sci. Immunol* vol. 3 <http://immunology.sciencemag.org/> (2018).
356. Próchnicki, T., Mangan, M. S. & Latz, E. Recent insights into the molecular mechanisms of the NLRP3 inflammasome activation [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* vol. 5 (2016).
357. Pelegrin, P. & Hafner-Bratkovi, I. Ion homeostasis and ion channels in NLRP3 inflammasome activation and regulation. *Curr. Opin. Immunol.* **52**, 8–17 (2018).
358. Tapia-Abellan, A. *et al.* Sensing low intracellular potassium by NLRP3 results in a stable open structure that promotes inflammasome activation. *Sci. Adv.* **in press**, (2021).
359. Muruve, D. A. *et al.* The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nat. Lett.* **452**, (2008).
360. Hornung, V. & Latz, E. Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation. *Eur. J. Immunol.* **40**, 595–653 (2010).
361. Keating, S. E., Baran, M. & Bowie, A. G. Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction. *Trends Immunol.* **32**, 574–581 (2011).
362. Wu, J. & Chen, Z. J. Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 461–88 (2014).
363. Yi, Y. S. Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical sensor of intracellular lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses. *Immunology* vol. 152 207–217 (2017).
364. Yang, J., Zhao, Y. & Shao, F. Non-canonical activation of inflammatory caspases by cytosolic LPS in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **32**, 78–83 (2015).
365. Rathinam, V. A. K., Zhao, Y. & Shao, F. Innate immunity to intracellular LPS. *Nat. Immunol.* **20**, 527–533 (2019).
366. Ruhl, S. & Broz, P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K⁺ efflux. *Eur. J. Immunol.* **45**, 2927–2936 (2015).

367. Meunier, E. & Broz, P. Interferon-inducible GTPases in cell autonomous and innate immunity. *Cell. Microbiol.* **18**, 168–180 (2016).
368. Man, S. M. *et al.* IRGB10 Liberates Bacterial Ligands for Sensing by the AIM2 and Caspase-11-NLRP3 Inflammasomes. *Cell* **167**, 382–396.e17 (2016).
369. Meunier, E. *et al.* Guanylate-binding proteins promote AIM2 inflammasome activation during *Francisella novicida* infection by inducing cytosolic bacteriolysis and DNA release. *Nat. Immunol.* **16**, 476–484 (2015).
370. Santos, J. C. & Broz, P. Sensing of invading pathogens by GBPs: At the crossroads between cell-autonomous and innate immunity. *Journal of Leukocyte Biology* vol. 104 729–735 (2018).
371. Pilla-moffett, D., Barber, M. F., Taylor, G. A. & Coers, J. Interferon-Inducible GTPases in Host Resistance, Inflammation and Disease. *J. Mol. Biol.* **428**, 3495–3513 (2016).
372. Liu, B. C. *et al.* Constitutive Interferon Maintains GBP Expression Required for Release of Bacterial Components Upstream of Pyroptosis and Anti-DNA Responses. *Cell Rep.* **24**, 155–168 (2018).
373. Zhao, Y. O., Khaminets, A., Hunn, J. P. & Howard, J. C. Disruption of the *Toxoplasma gondii* Parasitophorous Vacuole by IFN γ -Inducible Immunity-Related GTPases (IRG Proteins) Triggers Necrotic Cell Death. **5**, (2009).
374. Ha, H. J. *et al.* Molecular basis of IRGB10 oligomerization and membrane association for pathogen membranedisruption. *Commun. Biol.* **4**, (2021).
375. Kim, B.-H. *et al.* A family of IFN- γ -inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection kim2011.pdf. *Science (80-.)*. **332**, (2011).
376. Ngo, C. C. & Man, S. M. Mechanisms and functions of guanylate-binding proteins and related interferon-inducible GTPases: Roles in intracellular lysis of pathogens. *Cell. Microbiol.* **19**, (2017).
377. Yamamoto, M. *et al.* A cluster of interferon- γ -inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity* **37**, 302–313 (2012).
378. Man, S. M., Place, D. E., Kuriakose, T. & Kanneganti, T.-D. Interferon-inducible guanylate-binding proteins at the interface of cell-autonomous immunity and inflammasome activation. *J. Leukoc. Biol.* **101**, (2017).
379. Broz, P. *et al.* Caspase-11 increases susceptibility to *Salmonella* infection in the absence of caspase-1. *Nature* **490**, 288–291 (2012).
380. Meunier, E. *et al.* Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature* **509**, (2014).
381. Bitto, N. J. *et al.* Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
382. Finethy, R. *et al.* Inflammasome Activation by Bacterial Outer Membrane Vesicles Requires Guanylate Binding Proteins. <https://doi.org/10> (2017).
383. Santos, J. C. *et al.* LPS targets host guanylate-binding proteins to the bacterial outer membrane for non-canonical inflammasome activation. *EMBO J.* **37**, 1–19 (2018).
384. Vanaja, S. K. *et al.* Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. *Cell* **165**, 1106–1119 (2016).
385. Bitto, N. J. *et al.* Membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* activate the noncanonical inflammasome through caspase-5 in human monocytes. *Immunol. Cell Biol.* **96**, 1120–1130 (2018).
386. Santos, J. C. *et al.* LPS targets host guanylate-binding proteins to the bacterial outer membrane for non-canonical inflammasome activation. *EMBO J.* e98089 (2018) doi:10.15252/embj.201798089.
387. Ablasser, A. *et al.* Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. *Nature* **503**, 530–534 (2013).
388. Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. & Chen, Z. J. Cyclic GMP-AMP Synthase is a Cytosolic DNA Sensor that Activates the

- Type-I Interferon Pathway. *Science (80-.)*. **339**, (2013).
389. Kim, B.-H. *et al.* Interferon-induced guanylate-binding proteins in inflammasome activation and host defense. *Nat. Immunol.* **17**, 481–489 (2016).
390. Place, D. E., Muse, S. J., Kirimanjeshwara, G. S. & Harvill, E. T. Caspase-1-independent interleukin-1 β is required for clearance of Bordetella pertussis infections and whole-cell vaccine-mediated immunity. *PLoS One* **9**, 1–9 (2014).
391. Dumas, A. *et al.* The Inflammasome Pypin Contributes to Pertussis Toxin-Induced IL-1 β Synthesis, Neutrophil Intravascular Crawling and Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS Pathogens* vol. 10 (2014).
392. Evavold, C. L. & Kagan, J. C. How Inflammasomes Inform Adaptive Immunity. *J. Mol. Biol.* **430**, 217–237 (2018).
393. Pelegrin, P., Barroso-gutierrez, C., Pelegrin, P., Barroso-gutierrez, C. & Surprenant, A. P2X7 Receptor Differentially Couples to Distinct Release Pathways for IL-1b in Mouse Macrophage. *J. Immunol.* (2008) doi:10.4049/jimmunol.180.11.7147.
394. Nomura, F. *et al.* Cutting Edge: Endotoxin Tolerance in Mouse Peritoneal Macrophages Correlates with Down-Regulation of Surface Toll-Like Receptor 4 Expression. *J. Immunol.* **164**, 3476–3479 (2000).
395. Hagar, J. A., Powell, D. A., Aachoui, Y., Ernst, R. K. & Miao, E. A. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4- independent endotoxic shock. *Science (80-.)*. **341**, 1250–1253 (2013).
396. Lagrange, B. *et al.* Human caspase-4 detects tetra-acylated LPS and cytosolic Francisella and functions differently from murine caspase-11. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
397. Geurtsen, J. *et al.* Expression of the lipopolysaccharide-modifying enzymes PagP and PagL modulates the endotoxic activity of bordetella pertussis. *Infect. Immun.* **74**, 5574–5585 (2006).
398. Gomes, M. T. R., Cerqueira, D. M., Guimarães, E. S., Campos, P. C. & Oliveira, S. C. Guanylate-binding proteins at the crossroad of noncanonical inflammasome activation during bacterial infections. *J. Leukoc. Biol.* **106**, 553–562 (2019).
399. Olszewski, M. A., Gray, J. & Vestal, D. J. In Silico Genomic Analysis of the Human and Murine Guanylate-Binding Protein (GBP) Gene Clusters. *J. Interf. Cytokine Res.* **26**, 328–352 (2006).
400. Degrandi, D. *et al.* Extensive Characterization of IFN-Induced GTPases mGBP1 to mGBP10 Involved in Host Defense. *J. Immunol.* (2007).
401. Shenoy, A. R. *et al.* Emerging themes in IFN-gamma-induced macrophage immunity by the p47 and p65 GTPase families. *Immunobiology* **212**, 771–784 (2007).
402. Briard, B., Place, D. E. & Kanneganti, T. DNA Sensing in the Innate Immune Response. *Physiology* **9**, 112–124 (2020).
403. Hornung, V., Roers, A., Carus, G. & Universita, T. Review Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System. (2016) doi:10.1016/j.immuni.2016.04.002.
404. Medzhitov, D. B. S. and R. Recognition of Cytosolic DNA Activates an IRF3-Dependent Innate Immune Response. *Immunity* (2006).
405. Akira, S. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.* (2006).
406. Raeven, R. H. M. *et al.* Molecular and cellular signatures underlying superior immunity against Bordetella pertussis upon pulmonary vaccination. *Mucosal Immunol.* **11**, 979–993 (2018).
407. Leticia Corrales*, Seng-Ryong Woo*, Jason Williams*, Sarah M. McWhirter†, Thomas W. Dubensky†, and T. F. G. Antagonism of the STING pathway via activation of the AIM2 inflammasome by intracellular DNA. *J. Immunol.* **176**, 139–148 (2016).
408. Nakaya, Y., Lilue, J., Stavrou, S., Moran, E. A. & Ross, S. R. AIM2-like receptors positively and negatively regulate the interferon response induced by cytosolic DNA. *MBio* **8**, (2017).
409. Burke, T. P. *et al.* Inflammasome-mediated antagonism of type I interferon enhances Rickettsia pathogenesis. *Nat*

- microbiol.* **5**, 688–696 (2020).
410. Donoghue, E. J. O. & Krachler, A. M. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. 1508–1517 (2016) doi:10.1111/cmi.12655.
411. Kesty, N. C., Mason, K. M., Reedy, M., Miller, S. E. & Kuehn, M. J. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J.* **23**, 4538–4549 (2004).
412. Furuta, N. *et al.* Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. *Infect. Immun.* **77**, 4187–4196 (2009).
413. Furuta, N., Takeuchi, H. & Amano, A. Entry of Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles into epithelial cells causes cellular functional impairment. *Infect. Immun.* **77**, 4761–4770 (2009).
414. Boisvert, H. & Duncan, M. J. Clathrin-dependent entry of a gingipain adhesin peptide and Porphyromonas gingivalis into host cells. *Cell Microbiol.* **10**, 2538–2552 (2008).
415. Sandvig, K. & Van Deurs, B. Transport of protein toxins into cells: Pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett.* **529**, 49–53 (2002).
416. Sharpe, S. W., Kuehn, M. J. & Mason, K. M. Elicitation of epithelial cell-derived immune effectors by outer membrane vesicles of nontypeable haemophilus influenzae. *Infect. Immun.* **79**, 4361–4369 (2011).
417. Kaparakis, M. *et al.* Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **12**, 372–385 (2010).
418. Bomberger, J. M. *et al.* Long-distance delivery of bacterial virulence factors by pseudomonas aeruginosa outer membrane vesicles. *PLoS Pathog.* **5**, (2009).
419. Abdi, E. *et al.* Campylobacter jejuni outer membrane vesicles play an important role in bacterial interactions with human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **80**, 4089–4098 (2012).
420. Parker, H., Chitcholtan, K., Hampton, M. B. & Keenan, J. I. Uptake of Helicobacter pylori outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* **78**, 5054–5061 (2010).
421. Kunsmann, L. *et al.* Virulence from vesicles: Novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain. *Sci. Rep.* **5**, 13252 (2015).
422. El-Sayed, A. & Harashima, H. Endocytosis of gene delivery vectors: From clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Molecular Therapy* vol. 21 1118–1130 (2013).
423. Schaar, V. *et al.* Multicomponent Moraxella catarrhalis outer membrane vesicles induce an inflammatory response and are internalized by human epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **13**, 432–449 (2011).
424. Horvath, G. L., Schrum, J. E., De Nardo, C. M. & Latz, E. *Intracellular sensing of microbes and danger signals by the inflammasomes.* *Immunological Reviews* vol. 243 (2011).
425. Medzhitov, R. *et al.* MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* **2**, 253–258 (1998).
426. Deguine, J. & Barton, G. M. MyD88: A central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep.* **6**, 1–7 (2014).
427. Zamyatina, A. & Heine, H. Lipopolysaccharide Recognition in the Crossroads of TLR4 and Inflammatory Pathways. *Front. Immunol.* **11**, 1–22 (2020).
428. Vaure, C. & Liu, Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front. Immunol.* **5**, 1–15 (2014).
429. Hajjar, A. M., Tsai, J. H., Wilson, C. B. & Miller, S. I. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat. Immunol.* **3**, 354–359 (2002).
430. Brummelman, J. *et al.* Transcriptome signature for dampened Th2 dominance in acellular pertussis vaccine-induced CD4+ T cell responses through TLR4 ligation. *Sci. Rep.* **6**, 25064 (2016).

431. Cecil, J. D. *et al.* Outer membrane vesicles prime and activate macrophage inflammasomes and cytokine secretion in vitro and in vivo. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
432. Man, S. M., Karki, R. & Kanneganti, T. D. DNA-sensing inflammasomes: regulation of bacterial host defense and the gut microbiota. *Pathogens and disease* vol. 74 ftw028 (2016).
433. Man, S. M. *et al.* The transcription factor IRF1 and guanylate-binding proteins target activation of the AIM2 inflammasome by Francisella infection. *Nat. Immunol.* **16**, 467–475 (2015).
434. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology* vol. 16 343–353 (2015).
435. Evavold, C. L. & Kagan, J. C. How Inflammasomes Inform Adaptive Immunity. *Journal of Molecular Biology* vol. 430 217–237 (2018).
436. Gee, K., Guzzo, C., Mat, N. F. C., Ma, W. & Kumar, A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm. Allergy - Drug Targets* **8**, 40–52 (2009).
437. Marston, H. D., Paules, C. I. & Fauci, A. S. Monoclonal Antibodies for Emerging Infectious Diseases - Borrowing from History. *New* 1–4 (2018).
438. Suurs, F. V., Lub-de Hooge, M. N., de Vries, E. G. E. & de Groot, D. J. A. A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges. *Pharmacol. Ther.* **201**, 103–119 (2019).
439. Manis, J. P. Overview of Therapeutic monoclonal antibodies. (2022).
440. Weiner, G. J. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer* **15**, 361–370 (2015).
441. Bernard, A. & Boumsell, L. The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on human leucocyte differentiation antigens. *Hum. Immunol.* **11**, 1–10 (1984).
442. Ansar, W. & Ghosh, S. Monoclonal Antibodies: A Tool in Clinical Research. *Indian Journal of Clinical Medicine* vol. 4 IJCM.S11968 (2013).
443. Milstein, C. From the structure of antibodies to the diversification of the immune response. *EMBO Journal* **4**, 1083–1092 (1985).
444. Little, M., Kipriyanov, S. M., Le Gall, F. & Moldenhauer, G. Of mice and men: Hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol. Today* **21**, 364–370 (2000).
445. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
446. Liu, J. K. H. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann. Med. Surg.* **3**, 113–116 (2014).
447. Laminet, A. A., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C. & Pluckthun, A. The Escherichia coli heat shock proteins GroEL and GroES modulate the folding of the β -lactamase precursor. *EMBO J.* **9**, 2315–2319 (1990).
448. Mantis, N. J. Role of B Cells and Antibodies in Controlling Bacterial Pathogens. in *Encyclopedia of Microbiology* 194–200 (Elsevier Inc., 2019).
449. Wieser, A. *et al.* Efficient quantification and characterization of bacterial outer membrane derived nano-particles with flow cytometric analysis. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**, 1032–1037 (2014).
450. Kumar, C. M. S., Mande, S. C. & Mahajan, G. Multiple chaperonins in bacteria—novel functions and non-canonical behaviors. *Cell Stress Chaperones* **20**, 555–574 (2015).
451. Rauch, J. *et al.* GroEL is an immunodominant surface-exposed antigen of *Rickettsia typhi*. *PLoS ONE* vol. 16 (2021).
452. Abbady, A. Q., Al-Daoude, A., Al-Mariri, A., Zarkawi, M. & Muyldermans, S. Chaperonin GroEL a Brucella immunodominant antigen identified using Nanobody and MALDI-TOF-MS technologies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **146**, 254–263 (2012).

453. Sinha, K. & Bhatnagar, R. GroEL provides protection against Bacillus anthracis infection in BALB/c mice. *Mol. Immunol.* **48**, 264–271 (2010).
454. Lee, B. Y., Horwitz, M. A. & Clemens, D. L. Identification, recombinant expression, immunolocalization in macrophages, and T-cell responsiveness of the major extracellular proteins of Francisella tularensis. *Infect. Immun.* **74**, 4002–4013 (2006).
455. Mustafa, A. S. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. *Mol. Immunol.* **39**, 113–119 (2002).
456. Yamaguchi, H. *et al.* Effect of bacterial flora on postimmunization gastritis following oral vaccination of mice with Helicobacter pylori heat shock protein 60. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 808–812 (2003).
457. Nilsson, C. L., Larsson, T., Gustafsson, E., Karlsson, K. A. & Davidsson, P. Identification of protein vaccine candidates from Helicobacter pylori using a preparative two-dimensional electrophoretic procedure and mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72**, 2148–2153 (2000).
458. Bansal, A., Paliwal, P. K., Sagi, S. S. K. & Sairam, M. Effect of adjuvants on immune response and protective immunity elicited by recombinant Hsp60 (GroEL) of Salmonella typhi against S. typhi infection. *Mol. Cell. Biochem.* **337**, 213–221 (2010).
459. Khan, M. N., Shukla, D., Bansal, A., Mustoori, S. & Ilavazhagan, G. Immunogenicity and protective efficacy of GroEL (hsp60) of Streptococcus pneumoniae against lethal infection in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **56**, 56–62 (2009).
460. Paliwal, P. K., Bansal, A., Sagi, S. S. K., Mustoori, S. & Govindaswamy, I. Cloning, expression and characterization of heat shock protein 60 (groEL) of Salmonella enterica serovar Typhi and its role in protective immunity against lethal Salmonella infection in mice. *Clin. Immunol.* **126**, 89–96 (2008).
461. Burns, D. L., Gould-Kostka, J. L., Kessel, M. & Arciniega, J. L. Purification and immunological characterization of a GroEL-like protein from Bordetella pertussis. *Infect. Immun.* **59**, 1417–1422 (1991).
462. Chen, R. *et al.* Risk Factors of Fatal Outcome in Hospitalized Subjects With Coronavirus Disease 2019 From a Nationwide Analysis in China. *Chest* **158**, 97–105 (2020).
463. Ayoub, H. H., Mumtaz, G. R., Seedat, S. & Makhoul, M. Estimates of global SARS-CoV-2 infection exposure, infection morbidity, and infection mortality rates in 2020. *Glob. Epidemiol.* **3**, (2021).
464. David A. Berlin, R. M. G. and F. J. M. Severe Covid-19. *N Engl J Med.* **383**, (2020).
465. Qian, Z., Lu, S., Luo, X., Chen, Y. & Liu, L. Mortality and Clinical Interventions in Critically ill Patient With Coronavirus Disease 2019: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Med.* **8**, 1–15 (2021).
466. Dana, R. *et al.* Obesity and mortality in critically ill COVID-19 patients with respiratory failure. *Int. J. Obes.* **45**, 2028–2037 (2021).
467. Investigators, T. A. C.-19 C. C. O. S. (ACCCOS). Patient care and clinical outcomes for patients with COVID-19 infection admitted to African high-care or intensive care units (ACCCOS): a multicentre, prospective, observational cohort study. *Lancet* **397**, 1885–1894 (2021).
468. The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **384**, 693–704 (2021).
469. Sharma, S. *et al.* ICU Mortality in Patients With Coronavirus Disease 2019 Infection: Highlighting Healthcare Disparities in Rural Appalachia. *Crit. Care Explor.* **3**, e547 (2021).
470. Armstrong, R. A., Kane, A. D. & Cook, T. M. Anaesthesia - 2020 - Armstrong - Outcomes from intensive care in patients with COVID-19 a systematic review and.pdf. *Anaesthesia* **75**, 1340–1349 (2020).
471. Carbonell, R. *et al.* Mortality comparison between the first and second/third waves among 3,795 critical COVID-19 patients with pneumonia admitted to the ICU: A multicentre retrospective cohort study. *Lancet Reg. Heal. - Eur.* **11**, (2021).

472. Guillon, An., Laurent, E., Godillon, L., Kimmoun, A. & Grammatico-Guillon, L. In-hospital mortality rates of critically ill COVID-19 patients in France: a nationwide cross-sectional study of 45 409 ICU patients Antoine. *Br. J. Anaesth.* **127**, e178–e180 (2021).
473. Moore, J. B. & June, C. H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science (80-.)*. (2020) doi:10.1126/science.abb8925 (2020).
474. Channappanavar, R. & Perlman, S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin. Immunopathol.* **39**, 529–539 (2017).
475. Henry, B. M., Santos de Oliveira, M. H., Benoit, S., Plebani, M. & Lippi, G. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin. Chem. Lab. Med.* **58**, 1021–1028 (2020).
476. Zhu, Z. *et al.* Clinical value of immune-inflammatory parameters to assess the severity of coronavirus disease 2019. *Int. J. Infect. Dis.* **95**, 332–339 (2020).
477. Tang, N., Li, D., Wang, X. & Sun, Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J. Thromb. Haemost.* **18**, 844–847 (2020).
478. Portier, I., Campbell, R. A. & Denorme, F. Mechanisms of immunothrombosis in COVID-19. *Curr. Opin. Hematol.* **28**, 445–453 (2021).
479. Jose, R. J. & Manuel, A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. *Lancet Respir. Med.* **8**, e46–e47 (2020).
480. Lim, M. S. & Mcrae, S. COVID-19 and immunothrombosis: Pathophysiology and therapeutic implications. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **168**, (2020).
481. Harrison, C. Focus shifts to antibody cocktails for COVID-19 cytokine storm. *Nat. Biotechnol.* **38**, 905–908 (2020).
482. Gallos, G., Jones, D. R., Nasr, S. H., Emala, C. W. & Lee, H. T. Local anesthetics reduce mortality and protect against renal and hepatic dysfunction in murine septic peritonitis. *Anesthesiology* **101**, 902–911 (2004).
483. Yardeni, I. Z., Beilin, B., Mayburd, E., Levinson, Y. & Bessler, H. The effect of perioperative intravenous lidocaine on postoperative pain and immune function. *Anesth. Analg.* **109**, 1464–1469 (2009).
484. McCarthy, G. C., Megalla, S. A. & Habib, A. S. Impact of intravenous lidocaine infusion on postoperative analgesia and recovery from surgery: A systematic review of randomized controlled trials. *Drugs* vol. 70 1149–1163 (2010).
485. Lahat, A. *et al.* Lidocaine down-regulates nuclear factor- κ B signalling and inhibits cytokine production and T cell proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* **152**, 320–327 (2008).
486. Wang, H. L. *et al.* The protective effect of lidocaine on septic rats via the inhibition of high mobility group box 1 expression and NF- κ B activation. *Mediators Inflamm.* **2013**, (2013).
487. Romera, A. *et al.* Effect of Intravenous Lidocaine on Inflammatory and Apoptotic Response of Ischemia-Reperfusion Injury in Pigs Undergoing Lung Resection Surgery. *Biomed Res. Int.* **2021**, 1–9 (2021).
488. Zheng, M. *et al.* TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* **22**, 829–838 (2021).
489. Shirey, K. A., Blanco, J. C. G. & Vogel, S. N. Targeting TLR4 Signaling to Blunt Viral-Mediated Acute Lung Injury. *Front. Immunol.* **12**, 1–13 (2021).
490. Khanmohammadi, S. & Rezaei, N. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. *J. Med. Virol.* **93**, 2735–2739 (2021).
491. Shirato, K. & Kizaki, T. SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit induces pro-inflammatory responses via toll-like receptor 4 signaling in murine and human macrophages. *Heliyon* **7**, e06187 (2021).
492. Petruk, G. *et al.* SARS-CoV-2 spike protein binds to bacterial lipopolysaccharide and boosts proinflammatory activity. *J. Mol. Cell Biol.* **12**, 916–932 (2020).

493. Freeman, T. L. & Swartz, T. H. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. *Front. Immunol.* **11**, 1–12 (2020).
494. Rodrigues, T. S. *et al.* Inflammasomes are activated in response to SARS-cov-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J. Exp. Med.* **218**, (2020).
495. King, C. & Sprent, J. Dual Nature of Type I Interferons in SARS-CoV-2-Induced Inflammation. *Trends Immunol.* **42**, 312–322 (2021).
496. Akamatsu, M. A., de Castro, J. T., Takano, C. Y. & Ho, P. L. Off balance: Interferons in COVID-19 lung infections. *EBioMedicine* **73**, (2021).
497. Cagno, V. SARS-CoV-2 cellular tropism. *Lancet* **1**, 2020–2022 (2020).
498. Hin Chu*, Jasper Fuk-Woo Chan*, Terrence Tsz-Tai Yuen*, Huiping Shuai*, Shuofeng Yuan, Yixin Wang, Bingjie Hu, Cyril Chik-Yan Yip, Jessica Oi-Ling Tsang, Xiner Huang, Yue Chai, Dong Yang, Yuxin Hou, Kenn Ka-Heng Chik, Xi Zhang, Agnes Yim-Fong Fung, Hoi-Wa, K.-Y. Y. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe* 19–21 (2020).
499. McBride, R., van Zyl, M. & Fielding, B. C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* **6**, 2991–3018 (2014).
500. Klasse, P. J. Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. *Adv. Biol.* (2014).
501. Samaranyake, H., Wirth, T., Schenkwein, D., Rätty, J. K. & Ylä-Herttua, S. Challenges in monoclonal antibody-based therapies. *Ann. Med.* **41**, 322–331 (2009).
502. Harvey, W. T. *et al.* SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, (2021).
503. Mohammad, T., Choudhury, A., Habib, I., Asrani, P. & Mathur, Y. Genomic Variations in the Structural Proteins of SARS-CoV-2 and Their Deleterious Impact on Pathogenesis : A Comparative Genomics Approach. **11**, 1–14 (2021).
504. Barletta, W. A. Risk Factors of SARS-CoV-2 Infection: Global Epidemiological Study. *JMIRx Med* **2**, e28843 (2021).
505. Alimohamadi, Y., Tola, H. H., Abbasi-Ghahramanloo, A., Janani, M. & Sepandi, M. Case fatality rate of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *J. Prev. Med. Hyg.* **62**, E311–E320 (2021).
506. Saban, M., Myers, V. & Wilf-miron, R. Changes in infectivity, severity and vaccine effectiveness against delta COVID-19 variant ten months into the vaccination program: The Israeli case. *Prev. Med. (Baltim.)* **154**, (2021).
507. Camelo, S. *et al.* A comparison between virus- versus patients-centred therapeutic attempts to reduce COVID-19 mortality. *Emerg. Microbes Infect.* **10**, 2256–2263 (2021).
508. Toroghi, N. *et al.* Comparing efficacy and safety of different doses of dexamethasone in the treatment of COVID-19: a three-arm randomized clinical trial. *Pharmacol. Reports* **74**, 229–240 (2021).
509. Crothers, K. *et al.* Dexamethasone in hospitalised coronavirus-19 patients not on intensive respiratory support. *European Respiratory Journal* (2021). doi:10.1183/13993003.02532-2021.
510. Granholm, A. *et al.* Dexamethasone 12 mg versus 6 mg for patients with COVID-19 and severe hypoxaemia: a pre-planned, secondary Bayesian analysis of the COVID STEROID 2 trial. *Intensive Care Med.* **48**, 45–55 (2021).
511. Ngamprasertchai, T. *et al.* Efficacy and Safety of Immunomodulators in Patients with COVID-19: A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Infect. Dis. Ther.* **11**, 231–248 (2022).
512. Morris, G., Bortolasci, C. C., Puri, B. K., Marx, W. & Neil, A. O. The cytokine storms of COVID-19, H1N1 influenza, CRS and MAS compared. Can one sized treatment fit all? *Cytokine* **144**, (2021).
513. Hasanin, A. & Mostafa, M. Tocilizumab in patients with COVID-19: which patient, time, and dose? *J. Anesth.* **35**, 896–902 (2021).
514. Bortolotti, D. *et al.* Tlr3 and tlr7 rna sensor activation during sars-cov-2 infection. *Microorganisms* **9**, (2021).

515. Mabrey, F. L., Morrell, E. D. & Wurfel, M. M. TLRs in COVID-19: How they drive immunopathology and the rationale for modulation. *Innate Immun.* **27**, 503–513 (2021).
516. Karnina, R., Arif, S. K., Hatta, M. & Bukhari, A. Molecular mechanisms of lidocaine. *Ann. Med. Surg.* **69**, 102733 (2021).
517. Carolina, A. *et al.* IFN- γ is an independent risk factor associated with mortality in patients with moderate and severe COVID-19 infection. *Virus Res.* **289**, (2020).
518. Masood, K. I. *et al.* Upregulated type I interferon responses in asymptomatic COVID-19 infection are associated with improved clinical outcome. *Sci. Rep.* **11**, 1–14 (2021).
519. Park, A. & Iwasaki, A. Type I and Type III Interferons – Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. *Cell Host Microbe* **27**, 870–878 (2020).
520. Palermo, E., Di Carlo, D., Sgarbanti, M. & Hiscott, J. Type I interferons in covid-19 pathogenesis. *Biology (Basel)*. **10**, 1–18 (2021).
521. Maab, H., Mustafa, F. & Ali, S. A. Anti-inflammatory aspects of Lidocaine: a neglected therapeutic stance for COVID-19. *Hear. Lung* (2020).
522. Anna Rylova, Seema Chowdhury, Houman Amirfarzan, Kay B. Leissner, R. S. Intravenous lidocaine infusion in a case of severe COVID-19 infection. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* **37**, 481–3 (2021).
523. Muller, M. *et al.* Impact of intravenous lidocaine on clinical outcomes of patients with ARDS during COVID-19 pandemic (LidoCovid): A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials* **22**, 21–23 (2021).
524. Hasan, D. *et al.* A novel definition and treatment of hyperinflammation in COVID-19 based on purinergic signalling. *Purinergic Signal.* (2021) doi:10.1007/s11302-021-09814-6.
525. Sabin, N. S., Calliope, A. S., Simpson, S. V., Arima, H. & Ito, H. Implications of human activities for (re) emerging infectious diseases , including. **5**, 1–12 (2020).
526. Venkatesan, P. News Re-emergence of infectious diseases associated with the past. *The Lancet Microbe* **2**, e140 (2021).
527. Beyer, R. M., Manica, A. & Mora, C. Science of the Total Environment Shifts in global bat diversity suggest a possible role of climate change in the emergence of SARS-CoV-1 and SARS-CoV- 2. *Sci. Total Environ.* **767**, 145413 (2021).
528. Quinn, S. C. & Kumar, S. Health Inequalities and Infectious Disease Epidemics : A Challenge for Global Health Security. **12**, 263–273 (2014).
529. Anderson, B. D. & Gray, G. C. Emerging and Reemerging Infectious Diseases BD. *Encycl. Microbiol.* (2014).
530. Karmakar, M., Lantz, P. M. & Tipirneni, R. Association of Social and Demographic Factors With COVID-19 Incidence and Death Rates in the US. *JAMA* **4**, 1–12 (2021).
531. Pittman, M., Furman, B. L. & Wardlaw, A. C. Bordetella pertussis Respiratory Tract Infection in the Mouse : Pathophysiological Responses. *J. Infect. Dis.* **142**, 56–66 (1980).
532. van der Ark, A. A. J. *et al.* Resurgence of pertussis calls for re-evaluation of pertussis animal models. *Expert Rev. Vaccines* **11**, 1121–1137 (2012).
533. Soumana, I. H. *et al.* Modeling Immune Evasion and Vaccine Limitations by Targeted Nasopharyngeal Bordetella pertussis Inoculation in Mice. **27**, (2021).
534. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **157**, 1013–1022 (2014).
535. Kaparakis-Iliaskos, M. Helicobacter pylori Outer Membrane Vesicle size Determines Their Mechanisms of host cell entry and Protein content. **9**, (2018).
536. Ramasamy, S. & Subbian, S. Critical determinants of cytokine storm and type I interferon response in COVID-19

- pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **34**, 1–24 (2021).
537. Weischenfeldt, J. & Porse, B. Bone marrow-derived macrophages (BMM): Isolation and applications. *Cold Spring Harb. Protoc.* **3**, 1–7 (2008).
538. Westphal, O. & Jann, K. Bacterial Lipopolysaccharides. Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure. *Methods Carbohydr. Chem.* **5**, 83–91 (1965).
539. Hozbor, D., Rodriguez, M. E., Samo, A., Lagares, A. & Yantorno, O. Release of lipopolysaccharide during *Bordetella pertussis* growth. *Res. Microbiol.* **144**, 201–209 (1993).
540. Mariathasan, S. *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* vol. 440 228–232 (2006).
541. Kuida, K. *et al.* Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 β converting enzyme. *Science (80-)*. **267**, 2000–2003 (1995).
542. Rathinam, V. A. K. *et al.* The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat. Immunol.* **11**, 395–402 (2010).
543. Reed, L. J. & Muench, H. A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**, 493–497 (1938).